

Rec'd PCT/PTO 21 APR 2005

10/532264 #2

PCT/JP03/13420

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

21.10.03

RECEIVED

04 DEC 2003

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年10月22日

出願番号
Application Number: 特願2002-307573
[ST. 10/C]: [JP2002-307573]

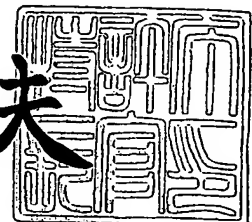
出願人
Applicant(s): エーザイ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3095985

【書類名】 特許願

【整理番号】 E1-A0203

【提出日】 平成14年10月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 京都市左京区下鴨蓼倉町 1 9 - 3 中川方

 【氏名】 皆木 康子

【発明者】

 【住所又は居所】 茨木市下穂積 1 - 2 - 3 0 - 4 0 3

 【氏名】 尾野 雄一

【発明者】

 【住所又は居所】 京都市右京区西京極佃町 1 3 番地 ラセットアベニュー
7 0 7

 【氏名】 坂本 佳正

【発明者】

 【住所又は居所】 奈良県大和郡山市新町 3 0 5 - 7

 【氏名】 水原 英理

【発明者】

 【住所又は居所】 京都市下京区高辻通大宮東入五坊大宮町 9 0 真徳ハイ
ツ 5 0 7

 【氏名】 中谷 智哉

【発明者】

 【住所又は居所】 神戸市西区学園東町 2 - 5 - 7 3

 【氏名】 高井 義美

【特許出願人】

 【識別番号】 000000217

 【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現している遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する65B13ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする以下の(1)～(4)のヌクレオチド配列から選択される配列を含むポリヌクレオチド。

(1)配列番号:1の177から2280番目の塩基、若しくは配列番号:2の127番目から2079番目の塩基を含む核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(2)配列番号:3若しくは4記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(3)配列番号:3若しくは4記載のアミノ酸配列においてシグナル配列部分を欠く配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(4)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換、または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(5)上記(1)の配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列

【請求項2】 請求項1記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項3】 請求項1記載のポリヌクレオチドまたは請求項2記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項4】 請求項1記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

【請求項5】 請求項4記載のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド断片。

【請求項6】 請求項4のポリペプチド、または請求項5記載のポリペプチド断片に対する抗体。

【請求項7】 請求項5記載のポリペプチド断片をコードするヌクレオチド鎖。

【請求項 8】 ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、請求項6記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

【請求項 9】 ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、請求項4記載のポリペプチドの少なくとも細胞外領域部分を含むペプチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

【請求項 10】 請求項8または9記載の方法により選択された分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞。

【請求項 11】 ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項10記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。

【請求項 12】 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、請求項10記載の前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、分裂停止後のドーパミン産生ニューロンにおいて発現している新規遺伝子65B13に関する。該遺伝子の発現を検出することにより、パーキンソン病(PD)等の神経変性疾患の移植治療において用いられるドーパミン産生ニューロン前駆細胞を効率的に分離することができる。

【0002】

【従来の技術】

ドーパミン系は、哺乳動物の脳において重要な運動調節、ホルモン分泌調節、情動調節等に関与する非常に重要な系である。従って、ドーパミン作動性神経伝達における異常は、様々な神経系の障害を引き起こす。例えば、パーキンソン病

(PD)は、中脳黒質のドーパミン産生ニューロンの特異的な脱落が原因で起こる錐体外路系の神経変性疾患である(HARRISON' S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 第2巻 第23版, Isselbacher et al.編, McGraw-Hill Inc., NY (1994) pp.2275-7)。治療法としては、産生されるドーパミン量の低下を補うためにL-DOPA(3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン)を経口投与する方法が主として行われているが、効果の持続性が良くないことが知られている。

【0 0 0 3】

最近では失われたドーパミン産生ニューロンを補うために、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む6～9週齢の中絶胎児の中脳腹側領域を移植する治療法も試みられている(米国特許第5690927号; Spencer et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8; Freed et al. (1992) N.Engl. J. Med. 327: 1549-55; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63; Kordower et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332: 1118-24; Defer et al. (1996) Brain 119: 41-50; Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80)。しかし、現在のところ、この方法では細胞の供給面、倫理面(Rosenstain (1995) Exp. Neurol. 33: 106; Turner et al. (1993) Neurosurg. 33: 1031-7)で問題があると共に、感染汚染の危険性、免疫学的な移植片拒絶(Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80; Widner and Brudin (1988) Brain Res. Rev. 13: 287-324)、胎児組織が糖分解よりも脂質代謝に主に依存しているための生存率の低さ(Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106)等の様々な面で問題が指摘されている。

【0 0 0 4】

倫理面や供給不足の問題を解決するために、例えばブタ由来の皮質、線条、及び中脳細胞を用いる方法等も提案されている(例えば、特表平10-508487号公報; 特表平10-508488号公報; 特表平10-509034号公報参照)。この方法においては、細胞表面上の抗原(MHCクラスI抗原)を改変するという煩雑な操作が必要とされる。そこで、中絶胎児由来の細胞に代えて、胚性幹細胞(ES)細胞、骨髓間質細胞などの非神経系細胞からのin vitroにおけるドーパミン産生ニューロンの分化系の利用が有望視されている。将来的にはES細胞若しくは患者本人の持つ神経幹細胞からの再生治療の重要性が増してくるものと思われる。移植片拒絶を解消する方法

としては、例えば、セルトリー細胞を同時に移植することにより、局在的に免疫抑制する方法も提案されている(特表平11-509170号公報;特表平11-501818号公報;Selawry and Cameron (1993) Cell Transplant 2: 123-9)。MHCがマッチする血縁者、他人の骨髄、骨髄バンク、及び臍帯血バンク等から移植細胞を得ることも可能であるが、患者自身の細胞を用いることができれば、余計な操作や手間なしに拒絶反応の問題も解決することができる。

【 0 0 0 5 】

その他、問題となるのは、ニューロン前駆細胞が不均一な細胞集団へと分化する可能性がある点である。パーキンソン病の治療においては、カテコールアミン含有ニューロンの中でもドーパミン産生ニューロンを選択的に移植することが必要である。これまで、パーキンソン病の治療に用いることが提案されている移植細胞としては、線条体(Lindvall et al. (1989) Arch. Neurol. 46: 615-31 ; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63)、ヒト胎児神経由来の不死化セルライン(特表平8-509215号公報;特表平11-506930号公報;特表2002-522070号公報)、NT2Z細胞の有糸分裂後ヒトニューロン(特表平9-5050554号公報)、ニューロン始原細胞(特表平11-509729号公報)、ドーパミン等のカテコールアミンを産生するように外来遺伝子によりトランスフェクトされた細胞、骨髄ストロマ細胞(特表2002-504503号公報;特表2002-513545号公報)等が挙げられる。しかしながらいずれも、ドーパミン産生ニューロンまたはドーパミン産生ニューロンへと分化する細胞のみを含むものではない。

【 0 0 0 6 】

未分化な細胞集団からドーパミン産生ニューロンを選択的に濃縮・分離する方法としては、ドーパミン産生ニューロンで発現するチロシンハイドロキシラーゼ等の遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を細胞集団の各細胞に導入し、蛍光を発する細胞を分離することにより、ドーパミン産生ニューロンを生きたまま可視化して濃縮・分離、または同定する方法(特開2002-51775号公報)が提案されている。この方法は、外来遺伝子の導入という工程を不可欠とするものであり、さらに、遺伝子治療に用いることを目的とする場合、レポーター遺伝子の存在は毒性、免疫原性の面からも問題で

ある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

現時点でのPD移植治療における大きな問題の一つは、中絶胎児の中脳腹側領域あるいはin vitroで分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、いずれも多種の細胞の混合物である点である。神経回路形成における安全性を考えると、目的の細胞種のみを分離してから用いるのが望ましく、また腫瘍形成の危険性を考慮すれば、分裂停止後の神経細胞を分離してから使用することが良いと考えられる。さらに、細胞の移植先の脳内での生存や、正しくネットワーク形成する能力を考えると、より早期の前駆細胞を分離することにより治療効果を増大させ得ると期待される。そこで、本発明者は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子の単離を試みた。

【0008】

【課題を解決するための手段】

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5マウス中脳腹側と背側のRNAを用いてサブトラクション法(N-RDA; representational difference analysis法; RDA法(Listsyn NA (1995) Trends Genet. 11:303-7)を改良(「DNA断片の量の均一化方法及びサブストラクション法」特願2001-184757(出願日2001/6/19))により発現に差のある遺伝子を増幅し、増幅された遺伝子の配列解析を行った。その結果、新規遺伝子として65B13が得られた。該遺伝子の全長配列をRACE法により決定した結果、2つのアルタナティブアイソフォームが得られ、各々、65B13-a及び65B13-bと名付けた。夫々の塩基配列を配列番号:1及び2として、そして、各塩基配列によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号:3及び4として記載する(図1~4)。

【0009】

そして、これらの遺伝子を用いたin situハイブリダイゼーションによる発現解析の結果と、脊髄における増殖マーカーであるKi67及び成熟マーカーであるNCAMと比較した結果得られた発現パターンから、65B13は分裂停止直後の神経前駆細胞で一過性に発現するものと考えられた。さらに、中脳での発現をドーパミン

産生ニューロンのマーカー遺伝子であるチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase; TH)の発現と比較したところ背-腹軸方向での発現領域が完全に一致しており、65B13は、中脳では分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現すると考えられた(図10及び11)。

【0010】

上述の結果から、抗65B13抗体を用いることにより、中脳腹側領域またはin vitroで分化誘導したドーパミン産生ニューロンを含む培養培地から、65B13発現細胞を分離することにより純粋な初期のドーパミンニューロン前駆細胞を得ることができるものと考えられる(図12)。そして、このようにして得られた細胞は、分裂停止後の前駆細胞のみが分離されたものであり、且つ目的の細胞種のみが分離されていることから、移植治療に用いた場合であっても安全性が高く、また、最も初期の前駆細胞が用いられることから生存率、ネットワーク形成能等の面でも高い治療効果が期待される。また、分裂直後の初期の前駆細胞で最高の治療効果が得られず、細胞を成熟した状態で利用することが求められる場合であっても、本方法により得られた初期の前駆細胞をin vitroで最適な分化段階へ培養により成熟させればよいことから、目的とする移植治療に適した分化段階の材料を容易に調製することが可能となる(図12)。

【0011】

さらに、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞及び前駆細胞からニューロンまでの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、PD治療のターゲット探索等にも有効である。また、本発明の方法により、最も初期の前駆細胞が得られることから、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、成熟を指標としてスクリーニング系等へ利用することもできる。

【0012】

より具体的には、本発明は

[1] 分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する65B13ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする以下の(1)～(4)のヌクレオチド配列から選択される配列を含むポリヌクレオチド。

(1)配列番号:1の177から2280番目の塩基、若しくは配列番号:2の127番目から207

9番目の塩基を含む核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(2) 配列番号:3若しくは4記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(3) 配列番号:3若しくは4記載のアミノ酸配列においてシグナル配列部分を欠く配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(4) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換、または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(5) 上記(1)の配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、

[2] [1]記載のポリヌクレオチドを含むベクター、

[3] [1]記載のポリヌクレオチドまたは[2]記載のベクターを含む宿主細胞、

[4] [1]記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

[5] [4]記載のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド断片、

[6] [4]のポリペプチド、または[5]記載のポリペプチド断片に対する抗体、

[7] [5]記載のポリペプチド断片をコードするヌクレオチド鎖、

[8] ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、[6]記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、

[9] ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、[4]記載のポリペプチドの少なくとも細胞外領域部分を含むペプチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、

[10] [8]または[9]記載の方法により選択された分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、

[11] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、[10]記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方

法、並びに

[12] 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、[10]記載の前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法、に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

<ポリヌクレオチド>

本発明のポリヌクレオチドは、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択するのに用いることができる抗体を作成する際の抗原を遺伝子工学的手法により得る際に使用することができる。本発明のポリヌクレオチドは、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する65B13ポリペプチドをコードする、配列番号:1(図1及び2)の177から2280番目の塩基、若しくは配列番号:2(図3及び4)の127番目から2079番目までの塩基を含む核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含むものである。

【0014】

ここで、「ポリヌクレオチド」とは、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指し、DNA、cDNA、ゲノムDNA、化学合成DNA及びRNAを含む。また、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、 β -D-ガラクトシルキユエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、 β -D-マンノシルキユエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリ

ジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9-β-D-リボフラノシル-2-メチルリオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5オキシ酢酸、ワイブトキソシン、プソイドウリジン、キューオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9-β-D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイブトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含むポリヌクレオチドも包含する。

【0015】

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する65B13ポリペプチドをコードする、配列番号3:若しくは4(各々図1、2若しくは図3、4、または図5参照)記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。このようなアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号:1及び2に記載された核酸配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号:1及び2記載の配列とは異なる核酸配列を含むものである。本発明のポリヌクレオチドを遺伝子工学的な手法によりポリペプチドを発現させるのに用いる場合、使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高いヌクレオチド配列を選択し、設計することができる(Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: r43-74)。本発明のポリヌクレオチドはまた、配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において、シグナル配列部分を欠く配列をコードする核酸配列を含むものを包含する。配列番号:3及び4記載のアミノ酸配列では、最初の17アミノ酸残基がシグナル配列に該当する。

【0016】

本発明のポリヌクレオチドは、さらに、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する65B13ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする、配列番号:3若しくは4のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。1若しくは複数個のアミノ酸が欠失

、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dabadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。

【0017】

ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により本発明のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を改変する場合、蛋白質の機能を保持することが必要な場合には、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコードするように配列を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸 (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸 (Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸 (Asp, Glu)、塩基性アミノ酸 (Arg, His, Lys)、中性アミノ酸 (Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸 (Ala, Gly)、分枝アミノ酸 (Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸 (Ser, Thr)、アミド型アミノ酸 (Gln, Asn)、含硫アミノ酸 (Cys, Met)、芳香族アミノ酸 (His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸 (His, Trp)、イミノ酸 (Pro, 4Hyp) 等に分類することができる。中でも、Ala、Val、Leu及びIleの間、Ser及びThrの間、Asp及びGluの間、Asn及びGlnの間、Lys及びArgの間、Phe及びTyrの間の置換は、蛋白質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数及び部位は特に制限されず、該ポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸が65B13の抗原性を有していれば良い。

【0018】

このような配列番号:3または4のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』 (Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』 (John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995

) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

【 0 0 1 9 】

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する65B13ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする、配列番号:1の177から2280番目の塩基、若しくは配列番号:2の127番目から2079番目の塩基を含む核酸配列または該核酸配列に相補的な配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、を含むポリヌクレオチドである。本発明の実施例では、配列番号:1及び2記載の2種類の配列を有する65B13のアイソフォームが得られているが、その他にもアルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が存在する可能性があり、そのようなアイソフォームやアレリック変異体も本発明のポリペプチドに含まれる。このようなポリヌクレオチドは、配列番号:1の177から2280番目の塩基、または配列番号:2の127番目から2079番目の塩基を含む核酸配列からなるポリヌクレオチドをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。cDNAライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

【 0 0 2 0 】

より具体的に、cDNAライブラリーの作製においては、まず、本発明のポリヌクレオチドを発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC法(Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9)等の公知の手法により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit(Pharmacia)等を用いてmRNAを精製する。QuickPrep mRNA Purificati

on Kit (Pharmacia)のような、直接mRNAを調製するためのキットを利用してもよい。次に得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)のようなcDNA合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNAはPCRを利用した5' -RACE法(Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32)により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高いcDNAライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法(Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56)等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られたcDNAは、適当なベクター中に組み込む。

【 0 0 2 1 】

本発明におけるハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer(Amersham Life Science)を用いた方法として、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、最後に、1×SSC、0.1%SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えばExpresshyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37～55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジェントな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジェントな条件としては68℃とすることができる。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプ

ローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、本発明の実施例において得られたマウス65B13のアイソフォーム、アレリック変異体、及び対応する他種生物由来の遺伝子を得るための条件を設定することができる。

【0022】

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection 9.47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection 6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995);条件については特にSection 2.10)等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号:1の177から2280番目の塩基、または配列番号:2の127番目から2079番目の塩基を含む核酸配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは70%、さらに好ましくは80%、より一層好ましくは90%(例えば、95%以上、さらには99%)の同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、BLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいたプログラムとして、アミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしてはBLASTX、ヌクレオチド配列についてはBLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、本発明の配列に対して使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照することができる。

【0023】

その他、遺伝子増幅技術(PCR)(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、65B13のアイソフォームやアレリック変異体等、65B13と類似した構造及び機能を有する遺伝子を、配列番号:1及び2に記載のヌクレオチド配列を基にプライマーを設計し、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。

【0024】

例えば、BLASTサーチの結果、本発明のマウス65B13のヌクレオチド配列に対して84%の同一性を有する3つの機能不明のヒト配列 (GenBank Accession No.: XM_048304, AL136654, BC007312; 各ヌクレオチド配列を配列番号:5、7、9、また該ヌクレオチド配列から予測されるアミノ酸配列を配列番号:6、8、9として記載する) は、マウス65B13に対するヒトホモログであると考えられる。このようなヒトホモログは、本発明の方法により、ヒトドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択に使用することができる。これらの配列は、記録されている情報から、全て第19染色体上の同じ遺伝子由来と配列と考えられる。そのうち、配列番号:7に示すAL136654と配列番号:8に示すBC007312の2つはcDNA断片であり、もう一つの配列番号:6に示すXM_048304は、ゲノム配列から予測されたmRNA配列と考えられた。これらの予測配列には、本発明の65B13とほぼ同じ大きさのORFがあり、予測されたアミノ酸配列の65B13との同一性は84%であった。

【0025】

本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)等により行うことができる。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

【0026】

<ヌクレオチド鎖>

さらに、本発明により、本発明のポリヌクレオチドに相補的な、少なくとも15塩基からなるヌクレオチド鎖が提供される。ここで「相補的な配列」とは、ヌクレオチド配列中の少なくとも15個の連続した塩基が鋳型に対して完全に対になっている場合のみならず、そのうちの少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上(例えば、97%または99%)が対になっているものも含む。対になっているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中のAに対しT(RNAの場合はU)、TまたはUに対しA、Cに対しG、そしてGに対しCが対応して鎖が形成されていることを意味する。そして相同性は、上述のハイブリ

ダイズするポリヌクレオチドの場合と同様の方法で決定することができる。

【0027】

このような本発明のヌクレオチド鎖は、本発明のポリヌクレオチドを検出または単離するためのプローブ、増幅するためのプライマーとして利用することができる。通常、プライマーとして使用する場合には15～100、好ましくは15～35個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも15、好ましくは30個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3'末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5'末端側には制限酵素認識配列、タグ等を付加した形態に設計することができる。本発明のヌクレオチド鎖は、本発明のポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができる。さらに、これらのプローブまたはプライマーを用いて、細胞内における本発明のポリヌクレオチドの変異を検出することができる。このような変異は、場合により本発明のポリペプチドの活性、または発現の異常を引き起こすものであることから、疾病の診断等に有用と考えられる。

【0028】

また、本発明のヌクレオチド鎖には、本発明のポリヌクレオチドの細胞内における発現をmRNAまたはDNAに対して結合することにより抑制するアンチセンス核酸、及び、mRNAを特異的に開裂することにより阻止するリボザイムが含まれる。

【0029】

アンチセンスが標的遺伝子の発現抑制作用の機構としては、(1)3重鎖形成による転写開始阻害、(2)RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3)合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、(4)イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(5)スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成による

ペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp.319-347 (1993))。

【0030】

本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸は、上述の(1)～(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸としては、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、本発明のポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21)等により調製することができる。

【0031】

リボザイムとは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)及びスモールリボザイム(small liboyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に5' -リン酸と3' -ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる5' -スプライス部位でのトランスエステル化反応を行うグループIイントロンRNA、(2)自己スプライシングをラリアット構造を経る二段階反応で行うグループIIイントロンRNA、及び(3)加水分解反応によるtRNA前駆体を5' 側で切断するリボヌクレアーゼPのRNA成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp程度)であり、RNAを切断して、5' -ヒドロキシル基と2' -3' 環状リン酸を生じさせる。スモールリボザ

イムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知であり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くのRNA配列と相補的となるように設計することにより、標的RNA中の塩基配列UC、UUまたはUAを認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990)蛋白質核酸酵素35: 2191; Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)。

【0032】

本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、またはnaked DNAとしてex vivo法またはin vivo法により遺伝子治療に用いることもできる。

本発明のヌクレオチド鎖の塩基配列の確認は、上述のポリヌクレオチドと同様の方法により行うことができる。

【0033】

<ベクター>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。本発明のベクターは、本発明のポリヌクレオチドを宿主細胞内に保持したり、該ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを発現させたりするのに有用である。本ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターが含まれる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。好まし

い態様においては、ベクターを導入した宿主細胞内で本発明のポリヌクレオチドが発現されるように制御配列下に結合する。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソーム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリAシグナル、スプライシング及びポリアデニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。また、本発明のベクターは、好ましくは選択可能なマーカーを含む。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。このようなシグナルペプチドは、天然において65B13に付加している17アミノ酸残基からなる、または異種蛋白質由来のシグナルペプチドであってもよい。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAGまたはTGA)の挿入を行ってもよい。

【0034】

本発明のベクターは、好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、*in vitro*でまたは、目的とする宿主細胞内で発現ベクター中にコードされるポリペプチドを発現することができる構築物を指す。クローニングベクター、バイナリーベクター、インテグレイティングベクター等が本発明の発現ベクターに含まれる。発現の過程には、発現ベクター中のコード配列の翻訳可能なmRNAへの転写、及びmRNAから本発明のポリペプチドへの翻訳、さらに場合によっては発現されたポリペプチドの小胞体内腔、ペリプラズムまたは細胞外への分泌が含まれる。

【0035】

*in vitro*におけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBEST(Promega)を例示することができる。また、*E. coli*等の原核細胞宿主における発現を可能にするプロモーターとしては P_L 、*araB*(Better et al. (1988) Science 240: 1041-3)、*lacZ*(Ward et al. (1989) Nature 341: 544-6; Ward et al. (1992

) FASEB J. 6: 2422-7)、trp、tac、trc(lacとtrpの融合)等のプロモーターが挙げられる。また、trpA由来、ファージ由来、rrnBリボソームRNA由来ターミネーターが、利用可能である。さらに、大腸菌用のベクターは、好ましくはベクターを宿主内で増幅するための「ori」、及び形質転換された宿主を選抜するためのマーカー遺伝子を持つ。アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、及びクロラムフェニコール等の薬剤により宿主の判別を行うことを可能にする薬剤耐性遺伝子の使用が好ましい。特に、ポリペプチドをペリプラズムへ分泌させることを目的とする場合、pelBシグナル配列(Lei et al. (1987) J. Bacteriol. 169: 4379)を使用することができる。例えば、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pCR-Script、pGEX-5X-1(Pharmacia)、pEGFP、pBluescript(Stratagene)、pET(Invitrogen;この場合の宿主はT7ポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)等のベクターを挙げることができる。また、特にサブクロニングまたは切出し用のベクターとしては、pGEM-T、pDIRECT、pT7等を例示できる。

【0036】

大腸菌以外の細菌宿主用としては、バチルス属のものが挙げられ、pUB110系、pcl94系のベクターが例示される。より具体的に、枯草菌由来のpPL608、pKTH50等を挙げることができる。その他、Pseudomonas putida、Pseudomonas cepacia等のシュードモナス属、Brevibacterium lactofermentum等のブレヴィバクテリウム属(pAJ43(Gene 39: 281 (1985))等)、Corynebacterium glutamicum等のコリネバクテリウム属(pCS11(特開昭57-183799号公報; pCB101(Mol. Gen. Genet. 196: 175 (1984))等)、ストレプトコッカス属(pHV1301(FEMS Microbiol. Lett. 26: 239 (1985))、pGK1(Appl. Environ. Microbiol. 50: 94 (1985))等)、ラクトバチルス属(pAM β 1(J. Bacteriol. 137: 614 (1979))等)、Rhodococcus rhodochrous等のロドコッカス属(J. Gen. Microbiol. 138: 1003 (1992))、Streptomyces lividans、Streptomyces virginiae等のストレプトマイセス属(Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual, Hopwood et al., Cold Spring Harbor Laboratories (1985)参照;pIJ486(Mol. Gen. Genet. 203: 468-78 (1986))、pKC1064(Gene 103: 97-9 (1991))、pUWL-KS(Gene 165: 149-50 (1995)))の細菌を宿主とするベクター系が開発されている。微生物を宿主として利用できる

ベクターについては、『微生物学基礎講座8 遺伝子工学』(共立出版)等の文献を参照することができる。ベクターを細菌宿主へ導入するための手法としては、塩化カルシウム法(Mandel and Higa (1970) J. Mol. Biol. 53: 158-62; Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166: 557-80)、エレクトポレーション法等を採用することができる。

【0037】

また、真核細胞宿主での発現を可能にする調節要素は、酵母を宿主とする場合には、AOX1及びGAL1プロモーターが例示される。酵母由来の発現ベクターとしては、Pichia Expression Kit (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01等が例示できる。酵母で利用可能なベクターに関しては、Adv. Biochem. Eng. 43: 75-102 (1990)、Yeast 8: 423-88 (1992)等に詳述されている。より具体的には、*Saccharomyces cerevisiae*等のサッカロマイセス属では、YRp系、YEp系、YCp系、及びYIp系ベクターが利用可能である。特に、多コピーの遺伝子導入が可能であり、安定に遺伝子を保持できるインテグレーションベクター(EP537456等)が有用である。その他、*Kluyveromyces lactis*等のクライベロマイセス属では、*S. cerevisiae*由来2 μ m系ベクター、pKD1系ベクター(J. Bacteriol. 145: 382-90 (1981))、pGK11由来ベクター、クライベロマイセス自律増殖遺伝子KARS系ベクター等、シゾサッカロマイセス属では、Mol. Cell. Biol. 6: 80 (1986)に記載のベクター、pAUR224(宝酒造)、チゴサッカロマイセスではpSB3(Nucleic Acids Res. 13: 4267 (1985))由来ベクター、*Pichia angusta*、*Pichia pastoris*等のピキア属ではYeast 7: 431-43 (1991)、Mol. Cell. Biol. 5: 3376 (1985)、Nucleic Acids Res. 15: 3859 (1987)等の文献記載のベクター、*Candida maltosa*、*C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. utilis*等のキャンディダ属では、特開平8-173170号公報記載のベクター、また*C. maltosa*由来のARS(Agri. Biol. Chem. 51: 1587 (1987))を利用したベクター、*Aspergillus niger*、*A. oryzae*等のアスペルギルス属では、Trends in Biotechnology 7: 283-7 (1989)記載のベクター、トリコデルマ属では菌体外セルラーゼ遺伝子由来プロモーター(Bio/Technology 7: 596-603 (1989))を利用したベクターが利用できる。

【0038】

哺乳動物及びその他の動物細胞を宿主とする場合には、アデノウイルスlateプロモーター(Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946)、CAGプロモーター(Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200)、CMV immediate earlyプロモーター(Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9)、EF1 α プロモーター(Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 5322; Kim et al. (1990) Gene 91: 217-23)、HSV TKプロモーター、SR α プロモーター(Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466)、SV40プロモーター(Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108)、SV40 earlyプロモーター(Genetic Engineering Vol.3, Williamson ed., Academic Press (1982) pp.83-141)、SV40 lateプロモーター(Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94)、RSV(ラウス肉腫ウイルス)-LTRプロモーター(Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704)、MLLV-LTRプロモーター、CMVエンハンサー、SV40エンハンサー、及びグロビンイントロン等を使用することができる。さらに、ネオマイシン、G418等の薬剤による判別を可能とする薬剤耐性遺伝子がベクターに含まれていることが好ましい。そして、細胞内で遺伝子のコピー数の増加を計る場合には、例えば核酸合成経路を欠損したCHOを宿主とし、その欠損を補うDHFR遺伝子を有するpCHOI等のベクターを採用し、メトトレキセート(MTX)によりコピー数を増幅させることができる。一方、遺伝子の一過性発現のためには、SV40のT抗原遺伝子を染色体上に有するCOS細胞を宿主とし、pcD等のSV40の複製起点、またはアデノウイルス、ウシパピーローマウイルス(BPV)、ポリオーマウイルス等の複製開始点を持つベクターを使用することができる。さらに、遺伝子コピー数の増幅のための選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)、チミジンキナーゼ(TK)、キサントシンアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)等をコードする遺伝子を含んでもよい。適当なベクターとして、例えば、Okayama-Bergの発現ベクターpcDV1(Pharmacia)、pCDM8(Nature 329: 840-2 (1987))、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(Invitrogen)、pSPORT1(GIBCO BRL)、pSV2dhfr(Mol. Cell. Biol. 1: 854-64 (1981))、pEF-BOS(Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990))、pCEP4(Invitrogen)、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13、pME18S(Mol. Cell. Biol. 8: 466-72 (1988))等が公知である。

【0039】

特に動物の生体内において本発明のポリヌクレオチドを発現させるためには、pAdexlcw等のアデノウイルスベクター、pZIPneo等のレトロウイルスベクターが挙げられる。ベクターはアデノウイルス法、エレクトポレーション(電気穿孔)法(Cytotechnology 3: 133 (1990))、カチオニックリポソーム法(カチオニックリポソームDOTAP(Boehringer Mannheim)等)、正電荷ポリマーによる導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)法、内包型リポソーム(internal type liposome)法、パーティクルガンを用いる方法、リポソーム法、リポフェクション(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987))、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、レセプター介在遺伝子導入法、レトロウイルス法、DEAEデキストラン法、ウイルス-リポソーム法(別冊実験医学『遺伝子治療の基礎技術』羊土社(1997);別冊実験医学『遺伝子導入&発現解析実験法』羊土社(1997); J. Clin. Invest. 93: 1458-64 (1994); Am. J. Physiol. 271: R1212-20 (1996); Molecular Medicine 30: 1440-8 (1993); 実験医学 12: 1822-6 (1994); 蛋白質核酸酵素 42: 1806-13 (1997); Circulation 92(Suppl.II): 479-82 (1995))、naked-DNAの直接導入法等により宿主に導入することができる。アデノウイルス及びレトロウイルス以外由来のウイルスベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、トガウイルス、パラミクソウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス等を元に作製されたベクターを利用することもできる。生体内への投与は、ex vivo法でもin vivo法で行ってもよい。

【0040】

その他、昆虫発現システムも異種ポリペプチドを発現させる系として知られており、例えば、Autographa californica核ポリヘドロシスウイルス(AcNPV)をベクターとし、Spodoptera frugiperda細胞、またはTrichoplusia larvae細胞中で外来遺伝子を発現させることができる。この際、目的とする外来遺伝子は、ウイルスの非必須領域にクローニングする。例えば、ポリヘドリンプロモーター制御下に連結してもよい。この場合、ポリヘドリン遺伝子は不活化され、コート蛋白質を欠く組換えウイルスが産生され、該ウイルスに感染したSpodoptera frugiperda

aまたは *Trichoplusia larvae* 等の細胞中で目的とするポリペプチドが発現される (Smith (1983) *J. Virol.* 46: 584; Engelhard (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3224-7)。その他、昆虫細胞由来の発現ベクターとして、Bac-to-BAC baculovirus expression system (Bigco BRL)、pBacPAK8 等も公知である。

【0041】

植物細胞を宿主とする場合には、例えばカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター等を利用したベクターが使用可能である。植物細胞へのベクターの導入法としては、PEG法、エレクトポレーション法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法等が公知である。

【0042】

ベクターへのDNAの挿入は、制限酵素サイトを利用したリガーゼ反応により行うことができる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。

【0043】

<宿主>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主が提供される。本発明のポリペプチドの製造には、*in vitro* 及び *in vivo* の産生系が考えられる。本発明の宿主には、古細菌、細菌、真菌類、植物、昆虫、魚類、両生類、ハ虫類、鳥類、哺乳類由来の原核及び真核細胞が含まれる。本発明の宿主は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に含むものである。該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になればよく、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

【0044】

細菌宿主としては、*E. coli* (JM109, DH5 α , HB101, XL1Blue)、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis* 等、エシェリシア属、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、セラチア属、バシルス属等に属するのグラム陽性及びグラム陰性細菌を例示することができる。

【0045】

真核宿主には、酵母等の真菌類、高等植物(*Nicotiana tabacum*由来細胞)、昆虫(ドロソフィラS2、スポロドプテラSf9、Sf21、Tn5)、魚類、両生類(アフリカツメガエル卵母細胞(Valle et al. (1981) *Nature* 291: 358-40))、ハ虫類、鳥類、哺乳類(CHO(J. Exp. Med. 108: 945 (1995); 中でもDHFR遺伝子欠損dhfr-CHO(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20 (1980)及びCHO K-1(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275 (1968))が好適である)、COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞)、ミエローマ、Vero、Namalwa、Namalwa KJM-1、HBT5637(特開昭63-299号公報)、植物(ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、ダイズ、トマト、コムギ、オオムギ、ライ麦、アルファルファ、亜麻等)等の細胞が含まれる。真菌類としては、*Saccharomyces*属に属する*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia*属等の酵母に加えて、糸状菌の*Aspergillus*属の*Aspergillus niger*等の細胞を宿主とした発現系も公知である。

【0046】

宿主細胞へのベクターの導入は、エレクトポレーション法(Chu et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 1311-26)、カチオニックリポソーム法、電気パルス穿孔法(*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987) Section 9.1-9.9)、微小ガラス管を使用した直接注入法、マイクロインジェクション法、リポフェクション(Derijard (1994) *Cell* 7: 1025-37; Lamb (1993) *Nature Genetics* 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) *Science* 259: 230-4)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL)、リン酸カルシウム法(Chen and Okayama (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745-52)、DEAEデキストラン法(Lopata et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 5707-17; Sussman and Milman (1985) *Mol. Cell. Biol.* 4: 1642-3)、FuGene6試薬(Boehringer-Mannheim)等により行い得る。

【0047】

<ポリペプチド及びその断片>

本発明の「ポリペプチド」は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるペプチド重合体である。配列番号:3または4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を好ましい例として挙げることができる。本発明のポリペプチドを構成するアミ

ノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。アミノ酸残基の修飾としては、アシル化、アセチル化、アミド化、アルギニル化、GP Iアンカー形成、架橋、 γ -カルボキシル化、環化、共有架橋の形成、グリコシル化、酸化、脂質または脂肪誘導体の共有結合化、シスチンの形成、ジスルフィド結合の形成、セレノイル化、脱メチル化、蛋白質の分解処理、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合化、ヒドロキシル化、ピログルタメートの形成、フラビンの共有結合化、プレニル化、ヘム部分の共有結合化、ホスファチジルイノシトールの共有結合化、ホルミル化、ミリストイル化、メチル化、ユビキチン化、ヨウ素化、ラセミ化、ADP-リボシル化、硫酸化、リン酸化等が例示される。さらに、本発明のポリペプチドにはシグナルペプチド部分がついた前駆体、シグナルペプチド部分を欠く成熟蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融合蛋白質を含む。本発明のポリペプチドに付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合蛋白質(MBP)、免疫グロブリン定常領域、 α -チューブリン断片、 β -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピソード)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Techol. 6: 1204-10)、lckタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10蛋白質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質)等の蛋白質の精製を容易にする配列(例えば、pcDNA3.1/Myc-His(Invitrogen)のようなベクターを利用できる)、組換え技術により蛋白質を生産する際に安定性を付与する配列等を選択することができる。

【0048】

さらに、本発明により本発明のポリペプチドの断片が提供される。本発明のポリペプチド断片は、本発明のポリペプチドの一部と同一であり、少なくとも8アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片である。特に好ましい断片としては、アミノ末端、カルボキシル末端、膜貫通ドメインを欠失したポリペプチド断片を挙げることができる。 α ヘリックス及び α ヘリックス形成領域、 α 両親媒性領域、 β シート及び β シート形成

領域、 β 両親媒性領域、基質結合領域、高抗原指数領域、コイル及びコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、ターン及びターン形成領域、並びに表面形成領域を含む断片が本発明のポリペプチド断片に含まれる。本発明のポリペプチド断片は、本発明のポリペプチドの抗原性さえ有すればどのような断片であってもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性／親水性を解析する方法(Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22)、二次構造を解析する方法(Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem 47: 251-76)により推定し、さらにコンピュータープログラム(Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認するPEPSCAN法(特表昭60-50068 4号公報)等により確認することができる。

【 0 0 4 9 】

本発明のポリペプチド、及びポリペプチド断片は公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することができる。遺伝子組換え技術により本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片を製造する場合、製造される蛋白質は、選択する宿主の種類によってグリコシル化を受ける場合と受けない場合、さらに分子量、等電点等が異なる場合がある。通常、大腸菌等の原核細胞を宿主としてポリペプチドを発現させた場合、得られるポリペプチドは本来ポリペプチドが有していたN-末端にメチオニン残基が付加された形で産生される。このような宿主の違いにより、構造の異なるポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。

【 0 0 5 0 】

<ポリペプチドの製造>

in vitroでポリペプチドを製造する場合、in vitroトランスレーション(Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44)等の方法に従って、細胞を含まない試験管内の系でポリペプチドを製造することができる。それに対して、細胞を用いてポリペプチドを製造する場合、まず、上述の中から適当な宿主細胞を選択し、目的とするDNAによる形質転換を行う。続いて形質転換された細胞を培養することにより所望のポリペプチドを得ることができる。培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には

、DMEM(Virology 8: 396 (1959)、MEM(Science 122: 501 (1952))、RPMI1640(J. Am. Med. Assoc. 199: 519 (1967))、199(Proc. Soc. Biol. Med. 73: 1 (1950))、IMDM等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清を添加し、pH 約6~8、30~40℃において15~200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

【0051】

一方、in vivoにおけるポリペプチドの生産系を確立するためには、動物または植物へ目的とするDNAを導入し、生体内においてポリペプチドを産生させる。ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシ等の哺乳動物、カイコ等の昆虫(Susumu (1985) Nature 315: 592-4)等の動物系が公知である(Lubon (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4: 1-54)。また、哺乳動物系においてトランスジェニック動物を用いることもできる。

【0052】

例えば、所望のポリペプチドをヤギの乳汁中に分泌させることを目的とする場合、該ポリペプチドをコードするDNAを β カゼイン等の乳汁中に特異的分泌される蛋白質をコードするDNAと結合し、目的ポリペプチドを融合蛋白質として発現させるようにする。次に、融合蛋白質をコードするDNAをヤギの胚へ導入する。DNAを導入した胚を雌ヤギの子宮へ移植する。このヤギから生まれるトランスジェニックヤギ、またはその子孫は乳汁中に所望のポリペプチドを分泌する。必要に応じ、乳汁量を増やすため、ホルモンを投与することもできる(Ebert et al. (1994) Bio/Technology 12: 699-702)。

【0053】

タバコ等の植物を用いたトランスジェニック植物のポリペプチド生産系が公知である。まず、所望のポリペプチドコードDNAをpMON530等の植物発現に適したベクターに組み込み、Agrobacterium tumefaciens等の細菌に導入する。DNAの導入された細菌をNicotina tabacum等の植物に感染させ、植物を再生させることにより、所望のポリペプチドを得られたトランスジェニック植物の葉より単離することができる(Julian et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 131-8)。その他の方

法としては、PEGを用いプロトプラストへDNAを導入して植物体を再生する方法(Gene Transfer to Plants, Potrykus and Spangenberg ed. (1995) pp. 66-74; インド型イネ品種に適する)、電気パルスによりプロトプラストへDNAを導入して植物体を再生する方法(Toki et al. (1992) Plant Physiol. 100: 1503-7; 日本型イネに適する)、パーティクルガン法で植物細胞に直接DNAを導入し植物体を再生する方法(Christou et al. (1991) Bio/Technology 9: 957-62)、アグロバクテリウムを介し細胞にDNAを導入し植物体を再生する方法(Hiei et al. (1994) Plant J. 6:271-82)等が確立されている。植物を再生する方法については、Toki et al. (1995) Plant Physiol. 100: 1503-7を参照することができる。

【0054】

トランスジェニック植物が一度得られた後は、さらに該植物の種子、果実、塊茎、塊根、株、切穂、カルス、プロトプラスト等を材料として同じように本発明のポリペプチドを産生する植物宿主を繁殖させ得ることができる。

【0055】

通常、遺伝子組換え技術により製造された本発明のポリペプチドは、まず、ポリペプチドが細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物を回収する。そして、蛋白質の精製方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、溶媒沈澱、溶媒抽出、硫酸またはエタノール沈澱等を適宜組合せることにより所望のポリペプチドを精製する。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0056】

また、天然由来のポリペプチドを精製して取得してもよい。例えば、後述の本

発明のポリペプチドに対する抗体、を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。また、GSTとの融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。本発明のポリペプチドを融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa等を使用して不要な部分を切断することもできる。さらに、必要に応じてキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシルエンドペプチダーゼ等の酵素を用い得られたポリペプチドを修飾することも可能である。

【0057】

本発明のポリペプチド断片は、上述の合成及び遺伝子工学的な手法に加えて、ペプチダーゼのような適当な酵素を用いて本発明のポリペプチドを切断して製造することもできる。

【0058】

<抗体>

本発明により、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片に対する抗体が提供される。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFV) (Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol.113, Rosenburg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp.269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv等の抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は必要に応じて、PEG等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質として製造され得、二次抗体を用いずに検出できるようにしてもよい。また、

ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るように改変されていてもよい。

【0059】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発現する細胞を感作抗原として製造することができる。また、本発明のポリペプチド若しくはその断片のうち短いものは、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合して免疫原として用いてもよい。また、本発明のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバント、完全(または不完全)フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強化するために用いてもよい。

【0060】

ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のポリペプチドまたはその断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得る。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原をPhosphate-Buffered Saline (PBS) または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4~21日毎に数回投与する。抗体の産生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

【0061】

モノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞と

ポリエチレングリコール(PEG)等を用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milsteinの方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46)に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞を挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液(HAT培養液)で培養して選択する。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポリペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を産生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照することもできる。

【0062】

ハイブリドーマは、その他、最初にEBウイルスに感染させたヒトリンパ球をin vitroで免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U266等)と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭63-17688号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(W092/03918; W093-02227; W094/02602; W094/25585; W096/33735; W096/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

【0063】

また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers LTD., UK参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を産生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる

。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991))。

【0064】

本発明の抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al. (1994) J. Immunol. 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) Methods Enzymol. 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol. 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) Trends Biotechnol. 9: 132-7参照)。

【0065】

本発明の多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) Behring Inst. Mill. 78: 118-32)、(2)異なるモノクローナル交代を分泌するハイブリドーマを融合する方法(Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髓腫細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクションした後、二特異性の一価部分を単離する方法(Zimmerman (1986) Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる(Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; W093/11161参照)。

【0066】

抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテインA及びGを用いて行う他、<ポリペプチドの製造>の項で詳細に記載した蛋白質精製技術によっても行い得る (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテインAを利用する場合、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia)等のプロテインAカラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等により決定することができる。

【0067】

抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA等により測定することができる。ELISA法により測定の場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いで本発明のポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次抗体がアルカリフォスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore(Pharmacia)等の市販の系を使用することもできる。

【0068】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド及びその断片の精製に使用することができる。また、パーキンソン病等に対する細胞移植治療に好適に使用され得るドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得るために利用することもできる。

【0069】

<ドーパミン産生ニューロンの選択方法>

本発明により分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択的に均一な集団として得る方法が提供された。より詳細には、本発明の65B13ポリペプチドに対する抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むことが予測される

細胞試料とを接触させ、抗体に結合する細胞を選択することで本発明のポリペプチドを発現している細胞、即ち、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を獲得できる(図12参照)。細胞との接触前に、抗体を適当な担体に固定化して用いることも可能である。または、細胞と抗体とを接触させ、結合させた後、抗体のアフィニティーによる精製を行うことで、該抗体と結合した細胞を選択的に回収することもできる。例えば、本発明の抗体がビオチンと結合されている場合には、アビジンやストレプトアビジンを結合したプレートやカラムに対して添加することにより精製を行うことができる。

【0070】

また、65B13はIgドメインを持つ接着分子様の構造を有し(図6参照)、培養細胞中で発現させた場合、65B13を発現させた細胞同士が接着することが判っている。65B13を発現させていない細胞とは接着しないため、65B13を介した接着はホモフィリックな結合であると考えられる。このような65B13ポリペプチドの性質から、65B13ポリペプチドの特に細胞外領域部分を利用し、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することもできる。例えば、適当な担体上に、65B13ポリペプチドの細胞外領域部分を固定し、細胞と接触させることによりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を取得することが可能である。従って、本発明により、本発明のポリペプチドの少なくとも細胞外領域部分を含むペプチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロンを選択する方法が提供される。

【0071】

その他、65B13に対するプロモーターを利用してドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することもできる(例えば、特開2002-51775号公報参照)。例えば、後述する65B13の発現領域解析により得られたプロモーター部分に対し、GFP等の検出可能なマーカーをコードする遺伝子を連結した構築物を含むベクターを細胞に対してトランスフェクションすることができる。その他、65B13遺伝子座へマーカーをコードする遺伝子をノックインすることができる。どちらの場合にも、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的にマーカー遺伝子の発現が検出されることとなり、特異的な細胞の選択が可能となる。

【0072】

ここで使用する細胞試料は好ましくは、中脳腹側領域の細胞、またはin vitroで分化誘導されたドーパミン産生ニューロンを含む培養培地である。in vitroにおけるドーパミン産生ニューロンの分化誘導は、公知のES細胞、骨髄間質細胞、神経由来の不死化セルライン(特表平8-509215号公報; 特表平11-506930号公報; 特表2002-522070号公報)、ニューロン始原細胞(特表平11-509729号公報)等の細胞を出発材料として、公知の方法により行うことができる。通常、ドーパミン産生ニューロンは、脳のドーパミン産生ニューロン領域から得た組織を神経組織由来の支持細胞層と共培養することにより分化させることができる。さらに、線条体及び皮質等の通常非ドーパミン産生神経組織からドーパミン産生細胞を誘導する方法も知られている(特表平10-509319号公報)。また、低酸素条件下での培養により、より多くドーパミン産生ニューロンを含む細胞が得られるとの報告も成されている(特表2002-530068号公報)。本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択に用いる細胞試料は、如何なる方法により分離または培養された細胞群であってもよい。

【0073】

また、本発明の抗体またはポリペプチドを固定する担体としては、細胞に対して無害なものである必要がある。例えば、合成または天然の有機高分子化合物、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭等の無機材料、及びこれらの表面に多糖類、合成高分子等をコーティングしたものが考えられる。担体の形状には特に制限はなく、膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状等が挙げられ、その厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、大きさを種々変えることにより接触面積を制御することができる。

【0074】

<ドーパミン産生ニューロン前駆細胞>

このようにして獲得された細胞は、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞をであることから、従来の雑多な細胞集団または外来遺伝子を導入したドーパミン産生ニューロンと比べて、安全性、生存率、ネットワーク形成能の面でPD等の神経変性疾患の移植治療に好ましいものである。さらに、本方法により

得られた本発明の細胞(群)は、分裂直後の前駆細胞であることから、in vitroにおいて培地等の条件を選択することにより適当な段階まで分化させることも可能であり、種々の神経移植治療の材料としても好ましいものである。本発明の方法により得られたニューロン前駆細胞の移植では、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 個、さらに好ましくは $5 \sim 6 \times 10^4$ 個のニューロンを移植する。第1の方法としては、細胞の懸濁液を脳に移植する定位脳固定術(stereotaxic surgery)が挙げられる。また、ミクロ手術(microsurgery)により細胞を移植しても良い。ニューロン組織の移植方法については、Backlund等(Backlund et al. (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73)、Lindvall等(Lindvall et al. (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68)、Madrazo等(Madrazo et al. (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4)の方法を参照することができる。

【0075】

さらに、本発明の細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、PD治療のターゲット探索、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、並びに成熟を指標としたスクリーニング等にも利用することができる。

【0076】

<遺伝子発現レベルの比較>

本発明の抗体を用いて得られた分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、該細胞において特異的に発現している遺伝子を単離する材料として使用することができる。さらに、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的に発現している遺伝子を調べ、単離することもできる。また、分化／誘導／増殖させた細胞と元の前駆細胞とにおいて発現レベルに差違のある遺伝子を調べることによりドーパミン産生ニューロンの生体内における分化に必要とされる遺伝子を調べることもできる。このような遺伝子はドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得るので、当該遺伝子を決定し、単離することは非常に有用である。

【0077】

本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞と該細胞から分化/誘導/増殖された細胞若しくはその他の細胞、または該分化/誘導/増殖された細胞とその他の細胞との間での遺伝子の発現レベルの比較は、慣用の細胞in situハイブリダイゼーション、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、RNAドットブロットハイブリダイゼーション、逆転写PCR、RNase保護アッセイ、DNAマイクロアレイハイブリダイゼーション、遺伝子発現の連続解析(SAGE; serial analysis of gene expression)(Velculescu et al. (1995) Science 270: 484-7)、差し引きハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)、代表差違分析(representation difference analysis; RDA)(Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7)等により行うことができる。

【0078】

細胞in situハイブリダイゼーションでは、特定のRNA配列に特異的な標識プローブを用い細胞から調製した総RNAまたはpolyA⁺RNAに対してハイブリダイゼーションを行うことにより、個々の細胞におけるRNAのプロセッシング、輸送、細胞質への局在化が起こる場所等を調べることができる。また、RNAの大きさをゲル電気泳動等によりサイズ分画して決定することもできる。また、定量的な蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)及びデジタル画像顕微鏡を用いれば、RNA転写産物をin situで視覚的に捉えることも可能であり(Femino et al. (1998) Science 280: 585-90)、本発明において利用することができる。

【0079】

遺伝子発現の解析で逆転写PCRを用いた場合、特定遺伝子の発現を大まかに定量することができる。本方法では、1つのRNA転写産物の種々のアイソフォームを検出及び解析することも可能である。逆転写PCRにおいてはまず、エキソン特異性プライマーを用いた逆転写PCRを行い、予想された産物以外の増幅産物が検出された場合、それらを解析することにより選択的スプライシングにより生じるmRNAアイソフォームを同定することが可能である。例えば、Pykett et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 559-64等に記載の方法を参照することができる。特に大まかな発現パターンを迅速に解析することが求められる場合、本発明のPCRを利用した本方法は、その速さ、感度の高さ、簡便さの点からも望ましいものである。

【0080】

DNAチップを使用することにより、遺伝子発現スクリーニングの能率を向上させることができる。ここで、DNAチップとは、ガラス等の担体表面上にオリゴヌクレオチドまたはDNAクローン等を高密度に固定した小型のアレイである。例えば、多重発現スクリーニングを行うためには、各目的遺伝子に対するcDNAクローンまたは該遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドをチップに対して固定化し、マイクロアレイを作製する。次に本発明のドーパミン特異的ニューロン前駆細胞、または該細胞より分化／誘導／増殖された細胞よりRNAを調製し、逆転写酵素処理を行い、cDNAを得る。次に、得られたcDNA試料を蛍光タグ等のタグにより標識し、マイクロアレイに対するハイブリダイゼーションを行う。その結果、総標識cDNA中、細胞内で活発に発現している遺伝子の割合が高くなり、あまり発現されていない遺伝子の割合は低くなる。即ち、標識cDNAとチップ上のcDNAクローンまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を意味する蛍光シグナルの強度は、標識cDNA内での各配列の発現の度合いを示すこととなり、遺伝子発現の定量を可能成らしめる。

【0081】

また、縮重PCRプライマーを用いた逆転写PCRを行うmRNAディファレンシャルディスプレイにより、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞について多数の遺伝子の発現を同時に解析することもできる。まず、特定のmRNAのpolyA尾部に3'末端の1または2つの塩基を変更した修飾オリゴdTプライマーを準備し、本発明の前駆細胞または該細胞から分化／増殖された細胞、及び、発現を比較する対照細胞から短離した総RNAに対して逆転写酵素反応を行う(Liang et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 3269-75)。変更した塩基が「G」であれば、polyA尾部の直前にCを持つmRNAを選択的に増幅することができ、また「CA」であれば、TGを直前に持つmRNAを増幅することができる。次に、第2のプライマーとして、10塩基程度の長さの任意の配列を有するものを用意し、修飾オリゴdTプライマー及び第2のプライマーを使用してPCR増幅反応を行う。増幅産物を泳動距離の長いポリアクリルアミドゲルを用いて電

気泳動し、サイズ分画する。このような方法により、本発明の細胞と対照細胞とで各細胞に特異的に発現しているmRNA由来のcDNAは、一方の試料を泳動した場合にのみ検出されるバンドとして検出することができる。この方法では、同定されていない遺伝子の発現についても解析することができる。

【0082】

SAGE分析は、多数の転写産物の発現を動じに検出することができ、また検出に特殊な装置を必要としない点で好ましい分析方法の一つである。まず、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞よりpolyA⁺RNAを慣用の方法により抽出する。次に、ビオチン化オリゴdTプライマーを用い、前記RNAをcDNAに変換し、4塩基認識制限酵素(アンカー用酵素;AE)で処理する。ここで、AE処理断片は、その3'末端にビオチン基を含んだ形となる。次に、AE処理断片をストレプトアビジンに結合させる、結合されたcDNAを2画分に分け、それぞれの画分を別々お2本鎖オリゴヌクレオチドアダプター(リンカー)A及びBに連結する。このリンカーは、(1)アンカー用酵素の作用で生じる突出部の配列と相補的な配列を有する1本鎖突出部、(2)タグ用酵素(tagging enzyme;TE)となるIIS型制限酵素(認識部位より20bp以下の離れた定位置の切断を行う)の5'塩基認識配列、及び(3)PCR用特異的プライマーを構成するのに十分な追加配列より構成される。ここで、リンカーを連結したcDNAをタグ用酵素で切断することにより、リンカー結合型の状態でcDNA配列部分のみが短鎖配列タグとなる。次に、リンカーの異なる2種類のプールを互いに連結し、リンカーA及びBに特異的プライマーを使用してPCR増幅する。その結果、増幅産物はリンカーA及びBに結合した2つの隣接配列タグ(ダイタグ;ditag)を含む多様な配列の混在物として得られる。そこで、増幅産物をアンカー用酵素により処理し、遊離したダイタグ部分を通常の連結反応により鎖状に連結し、クローニングを行う。クローニングにより得られたクローンの塩基配列を決定することにより、一定長の連続ダイタグの読み出しを得ることができる。このようにしてクローンの塩基配列を決定し、配列タグの情報が得られれば、それぞれのタグに該当するmRNAの存在を同定することができる。

【0083】

差し引きハイブリダイゼーションは、種々の組織または細胞間で発現の差違のある遺伝子のクローニングによく用いられる方法であるが、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、またはそれから分化／誘導／増殖された細胞において特異的に発現している遺伝子をクローニングするのにも使用することができる。まず、本発明の前記細胞のうちの試験する細胞のDNA試料を調製する(以下、テストDNAと呼ぶ)。次に、比較する細胞のDNA(以下、ドライバーDNAと呼ぶ)を調製する。テストDNAとドライバーDNAとを逆に用いることもできる。いずれにせよ、テストDNAに存在し、ドライバーDNAに存在しない遺伝子の存在が検出される。次に、調製したテストDNA及び大過剰量のドライバーDNAを混合し、変性させ一本鎖DNAとした後にアニーリングさせる。アニーリング条件を調節することにより、ドライバーDNA中には存在しない特異的な配列をテストDNA由来のDNAのみからなる二本鎖DNAとして単離することができる。より詳細な方法については、Swaroop et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1954及びYasunaga et al. (1999) Nature Genet. 21: 363-9等を参照することもできる。

【0084】

RDA法は、PCRを利用した、ドライバーDNAに存在しないテストDNA中の配列を選択的に増幅することを可能とする方法であり、上述のその他の方法と同様に本発明において用いることができる。より詳細な手順については、Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7及びSchutte et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5950-4を参照することができる。

【0085】

以上のようにして検出、単離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的な遺伝子を上述の各種公知の方法によりベクター等に挿入し、配列決定、発現解析を行うこともできる。

【0086】

<前駆細胞の成熟を指標としたスクリーニング>

本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む、スクリーニング方法が提供される。本方法によりスクリーニングされる化

化合物は、ドーパミン産生ニューロンの分化、増殖等を調節する機能を示すことから、ドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得、有用と考えられる。

【0087】

ここで、「被験物質」とはどのような化合物であってもよいが、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーが挙げられる。

【0088】

細胞の分化や増殖は、被験物質と接触させない場合における細胞の状態と比較することにより検出することができる。細胞の分化や増殖は、顕微鏡下において形態学的な観察を行うこと、または、細胞で産生されるドーパミン等の物質を検出、定量して検出してもよい。

【0089】

<65B13の発現領域解析>

本発明により65B13遺伝子の発現制御領域が提供される。本発明の発現制御領域は、本発明のポリヌクレオチドを利用してゲノムDNAから公知の方法によってクローニングすることができる。例えば、S1マッピング法のような転写開始点の特定方法(細胞工学 別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 東京大学医科学研究所制癌研究部編, 秀潤社(1993) pp.362-374)が公知であり、本発明において利用できる。一般に、遺伝子の発現制御領域は、遺伝子の5'末端の15~100bp、好ましくは30~50bpをプローブDNAとして利用して、ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる(本発明においては、配列番号:1の1~176番目または配列番号:2の1~126番目の塩基全部またはその1部)。このようにして得られるクローンは、10kbp以上の5'非翻訳領域を含むものであるので、次にエキソヌクレアーゼ等により処理し短縮化または断片化する。最後に、短縮された発現制御領域の候補を含む配列部分をレポーター遺伝子を利用

して、その発現の有無、強さ、制御等について評価し、本発明の65B13の発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を決定することができる。

【0090】

遺伝子の発現制御領域は、Neural Network等のプログラム(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996))を用いて予測することもできる。さらに、発現制御領域の活性最小単位を予測するプログラム(<http://biosci.cbs.umn.edu./software/proscan/promoterscan.htm>; Prestidge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-32)も公知であり、本発明において用いることができる。

【0091】

このようにして短離された、65B13遺伝子の発現領域は、in vivoで分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的に所望の蛋白質を産生するのに利用することもできる。

【0092】

<リガンドの同定>

本発明により、本発明のポリペプチドに対するリガンドが提供された。本発明のポリペプチドは膜貫通ドメインを有することから、天然において細胞膜中に埋め込まれた状態で存在すると考えられる。分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞で一過性に発現されていることから、ニューロンの成熟に関与していることが考えられる。従って、本発明のポリペプチドに対するアゴニストやアンタゴニスト等の機能を示す可能性があるリガンドは、ドーパミン産生ニューロンのin vivo、ex vivo及びin vitroにおける分化を制御するのに利用できる可能性がある。本発明のポリペプチドに対するリガンドの同定においては、まず、本発明のポリペプチドと候補化合物とを接触させ、結合の有無を検定する。この際、本発明のポリペプチドを担体に固定したり、細胞膜に埋め込まれた状態に発現させて用いることもできる。候補化合物としては特に制限はなく、遺伝子ライブラリーの発現産物、海洋生物由来の天然成分、各種細胞の抽出物、公知化合物及びペプチド、植物由来の天然成分、生体組織抽出物、微生物の培養上清、並びに

ファージディスプレイ法等によりランダムに製造されたペプチド群(J. Mol. Bio 1. 222: 301-10 (1991))等が含まれる。また、結合の検出を容易にするために、候補化合物は標識しても良い。

【0093】

【実施例】

以下、実施例により本発明についてより詳細に検討するが、本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。

[実施例1] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子の単離及び配列解析

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5 マウス中脳腹側と背側のRNAを用いてサブトラクション(N-RDA)法により発現の差のある遺伝子を増幅し、得られた遺伝子の配列を解析した。

【0094】

1. N-RDA法

1-1. アダプターの調製

下記のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、100 μ Mに調製した。

(ad2: ad2S+ad2A、ad3: ad3S+ad3A、ad4: ad4S+ad4A、ad5: ad5S+ad5A、ad13: ad13S+ad13A)

ad2S: cagctccacaacctacatcattccgt (配列番号:8)

ad2A: acggaatgatgt (配列番号:9)

ad3S: gtccatcttctctctgagactctggt (配列番号:10)

ad3A: accagagtctca (配列番号:11)

ad4S: ctgatgggtgtcttctgtgagtgtgt (配列番号:12)

ad4A: acacactcacag (配列番号:13)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgtgacagt (配列番号:14)

ad5A: actgtcacactg (配列番号:15)

ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgatcgt (配列番号:16)

ad13A: acgatcgacagt (配列番号:17)

1-2. cDNA合成

マウス12.5日胚(日本SLC)中脳腹側及び背側領域よりRNeasy mini kit (Qiagen

)を用い全RNAを調製し、cDNA synthesis kit (TAKARA)を用いて二本鎖cDNAを合成した。制限酵素RsaIで消化したのち、ad2を付加し、ad2Sをプライマーとして72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を15サイクルのPCRを行い、最後に72℃で2分インキュベートし、cDNAを増幅した。N-RDAのPCRはすべて以下の反応液組成で行った。

10×ExTaq	5 μ l
2.5mM dNTP	4 μ l
ExTaq	0.25 μ l
100 μ M primer	0.5 μ l
cDNA	2 μ l
蒸留水	38.25 μ l

1-3.Driverの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに、94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を5サイクルのPCRを行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。1回のサブトラクションに3 μ gずつ使用した。

1-4.Testerの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を5サイクルのPCRを行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。60ngのRsaI消化cDNAにad3を付加した。

1-5.サブトラクション1回目

上記3及び4で作製したTesterおよびDriverを混合し、エタノール沈殿した後に、1xPCR buffer 1 μ lに溶解した。98℃ 5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 1 μ lを加えた。さらに98℃5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイズさせたcDNAをad3Sをプライマーとして72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を10サイクル行った。続いて、Mung Bean Nuclease (TAKARA)で消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。さらに94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で3

0秒、及び72℃で2分の反応を13サイクルのPCRを行い、最後に72℃で2分インキュベートした。

1-6. 均一化

サブトラクション1回目で増幅したcDNA 8ngに2xPCR buffer 1 μ lを加えた。98℃5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 2 μ lを加えた。さらに98℃5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイズさせたcDNAをRsaIで消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。これをad3Sをプライマーとして94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を11サイクルのPCRを行い、最後に72℃で2分インキュベートした。RsaIで消化し、ad4を付加した。

1-7. サブトラクション2回目

上記6でad4を付加したcDNA 20ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したcDNAにad5を付加した。

1-8. サブトラクション3回目

上記7でad5を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したcDNAにad13を付加した。

1-9. サブトラクション4回目

上記8でad13を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、以下、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。増幅したcDNAをpCRII (Invitrogen)にクローニングし、ABI3100シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。

【 0 0 9 5 】

次に、N-RDA法により得られた65B13断片の配列を用い、以下の方法でRACEを行った。

2. RACE法

マウス12.5日胚脳よりRNeasy mini kit (Qiagen)により全RNAを調製し、 μ MAC S mRNA isolation kit (Miltenyi Biotec)を用いてmRNAを調製した。調製したm

RNAより、Superscript choice system (Invitrogen)およびpCRIIベクター(Invitrogen)を用いてcDNAライブラリーを調製した。これよりプラスミドDNAを調製し、以下のプライマーを用いてPCRを行った。

TAU2: GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTC (配列番号:18)

TAU4: CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC (配列番号:19)

TAD3: AGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGG (配列番号:20)

TAD4: CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG (配列番号:21)

65B13 F1: CTTCCCGTATGCTACCTTGTCTCCAC (配列番号:22)

65B13 F2: TCCATCTCTCCAAGTGAAGGGTCTTG (配列番号:23)

65B13 R1: CCAACAGTCCTGCATGCTTGTAAATGA (配列番号:24)

65B13 R2: TCCTTCAATGTTTCAGTTTTGGAGGGG (配列番号:25)

PCRの条件は次の通りであった。

1st PCR

10×ExTaq	2 μ l
2.5mM dNTP	1.6 μ l
ExTaq	0.1 μ l
100 μ M TAU2またはTAD3	0.04 μ l
100 μ M 65B13 F1またはR1	0.2 μ l
cDNA (10ng/ μ l)	1 μ l
蒸留水	15.06 μ l

94℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で5分の反応を25サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。続いて、1回目のPCRにより得られた産物を100倍希釈して2nd PCRを行った。2nd PCRの条件は次の通りであった。

2nd PCR

10×ExTaq	5 μ l
2.5mM dNTP	4 μ l
ExTaq	0.25 μ l
100 μ M TAU4またはTAD4	0.1 μ l

100 μ M 65B13 F2またはR2 0.5 μ l

1/100 1st PCR産物 1 μ l

蒸留水 15.06 μ l

94℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で5分の反応を25サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。増幅されたcDNA断片をpCRIIにクローニングし、ABI3100シーケンスアナライザーを用いてシーケンスの解析を行った。

【0096】

得られた2つの遺伝子、65B13-a及び65B13-bのヌクレオチド配列を配列番号:1(図1及び2)、及び配列番号:2(図3及び4)として示す。65B13-aのコード領域は、配列番号:1の177番目のAから始まり、2278~2280番目の終止コドンまで続き、700アミノ酸からなる蛋白質をコードする。そして、そのうち177番目から228番目までの配列にコードされる17アミノ酸残基はシグナル配列、1717番目から1767番目までの配列にコードされる17アミノ酸残基は膜貫通領域であった。それに対し、65B13-bのコード領域は、配列番号:2の127番目のAから始まり、2277~2079番目の終止コドンまで続き、650アミノ酸からなる蛋白質をコードする。そして、そのうち127番目から177番目までの配列にコードされる17アミノ酸残基はシグナル配列、1516番目から1566番目までの配列にコードされる17アミノ酸残基は膜貫通領域であった。65B13-a及び65B13-b遺伝子にコードされるアミノ酸配列を配列番号:3及び4として示す。図5において示すように、両遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を比較したところ、65B13-aと65B13-bとはアルタナティブスプライシングによるアイソフォームであり、65B13-bは65B13-aに対しN末端側の50アミノ酸が欠失いることが判明した。65B13遺伝子によりコードされる蛋白質はホモロジーサーチにより、図6に示すような5つのIgドメインを持つ、一回膜貫通型蛋白質であると考えられた。

【0097】

[実施例2]65B13遺伝子の発現解析

次に、これらの遺伝子を用いて以下のプロトコールによりin situハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。

まず、マウス12.5日胚をOCTで包埋し、厚さ16 μ mの新鮮凍結切片を作製した。スライドガラス上で乾燥させた後に4%PFAで室温30分間固定した。PBSで洗浄した後、ハイブリダイゼーション (1 μ g/mlDIG化RNAプローブ、50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS, 50 μ g/ml yeast RNA, 50 μ g/ml Heparin) を65度で40時間行った。その後、洗浄 (50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS) を65度で行い、RNase処理 (5 μ g/ml RNase) を室温5分間行った。0.2xSSCで65度の洗浄、1xTBSTで室温の洗浄ののち、ブロッキング (Blocking reagent: Roche) を行った。アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体 (DAKO) を反応させ、洗浄 (1xTBST、2mM Levamisole) の後、NBT/BCIP (DAKO) を基質として発色させた。

【0098】

そして、これらの遺伝子を用いたin situハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期であるE12.5で、65B13が中脳腹側、小脳原基、後脳、及び脊髄で発現していることが判った(図7)。脊髄における発現をさらに増殖マーカーであるKi67及び成熟マーカーであるNCAMと比較したところ、Ki67陽性の神経前駆細胞(neural progenitor)の増殖する領域である脳室領域(ventricular zone; VZ)内の一部の細胞に65B13が発現しているのに対し、分裂停止後のより成熟したNCAM陽性の前駆細胞の存在する外套層(mantle layer; ML)内には発現が認められなかった(図8)。脊髄以外の領域でも同様に、VZ内の一部の細胞で発現が認められた。これらの発現パターンから、65B13は分裂停止直後の神経前駆細胞で一過性に発現するものと考えられた。

【0099】

中脳では、最も腹側にあたる領域のVZ内のみで発現が認められた。ドーパミン産生ニューロンのマーカー遺伝子であるチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase; TH)の発現と比較すると、THはMLにのみ発現しているため同一の細胞で両者の発現が認められることはないものの、背-腹軸方向で発現領域が完全に一致していることが判明した(図9)。一般に神経管内の神経細胞は、まずVZ内で増殖し、分化開始と共に分裂を停止し、その後、すぐ外側のMLに移動してから成熟することが知られている。従って、ドーパミン産生ニューロンの前駆体は、TH発現領域のすぐ内側のVZ内で増殖し、分裂停止後に外側に移動してからTHを発現

するものと考えられている。この前駆体の増殖するVZ領域が65B13の発現領域と一致することから、65B13は、中脳では分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現すると考えられた(図10及び11)。

【0100】

【発明の効果】

本発明により、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する新規遺伝子65B13が得られた。細胞における該65B13の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成面の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となった。また、分裂停止直後のニューロン前駆細胞を選択的に得られるため、成熟した細胞の求められる治療等において使用する場合であっても、*in vitro*で最適な状態へと容易に分化させることができる。さらに、本発明の遺伝子を用いて得られるドーパミン産生ニューロン前駆細胞により、該細胞に特異的に発現している遺伝子を単離することが可能となった。該細胞は、パーキンソン病等の神経変性疾患に対する医薬を開発する上でも有用と考えられる。分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞という、ニューロン形成における初期の前駆細胞は、さらに、ニューロンの成熟過程、即ち、成熟過程に関与する種々の因子を明らかにするのに役立つ。このような因子の解明は、神経変性疾患の治療に大きく貢献することが予期される。さらに、該細胞の成熟を指標として、その過程を調節(阻害または促進)するような物質のスクリーニングに用いることもできる。

【0101】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> Gene specifically expressed in postmitotic dopaminergic

neuronal precursor

<130> E1-A0203

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2876

<212> DNA

<213> mouse

<400> 1

```
gatgagccag atttcgggga ctctgggcca gacataaaat cttccagccc ggagagaatt 60
gtgtgcagag aggggctcca gtccagcgtg gtgtgagagg cgtgctatca agaaagaagt 120
tggaggggaa ccagtgaac cctaactcta cgagatcttg gggtagacac actcgggatg 180
ctggcctccg ccctcctcgt tttcctttgc tgtttcaaag gacatgcagg ctcatcgccc 240
catttcctac aacagccaga ggacatggtg gtgctgttgg gggaggaagc ccggctgccc 300
tgcgctctgg gcgcgtacag ggggctcgtg cagtggacta aggatgggct ggctctaggg 360
ggcgaaagag accttcagg gtggtcccgg tactggatat cggggaattc agccagtggc 420
cagcatgacc tccacattaa gcctgtggaa ttggaagatg aggcacgta tgagtgccag 480
gcttcgcaag caggtctccg atcacacca gcccaactgc acgtgatggt cccccagaa 540
gtccccagg tactaggcgg cccctctgtg tctctggttg ctggagtcc tggaatctg 600
acctgtcgga gtcgtgggga ttcccgacct gccctgaac tactgtggtt ccgagatggg 660
atccggctgg atgcgagcag cttccaccag accacgtga aggacaaggc cactggaaca 720
```

gtggaaaaca ccttattcct gacccttcc agtcatgatg atggcgccac cttgatctgc 780
agagcgcgaa gccaggccct gccacaggg agggacacag ctgttacact gacccctcag 840
tatccccaa tgggtgactct gtctgctgag cccagactg tgcaggaggg agagaaggtg 900
actttcctgt gtcaagccac tgcccagcct cctgtcactg gctacaggtg ggcgaagggg 960
ggatccccgg tgctcggggc acgtgggcca aggttggagg tcgttgcaga tgccactttc 1020
ctgactgagc cgggtgcctg cgaggtcagc aacgcggtcg gaagcgccaa ccgcagcacg 1080
gcgctggaag tgttgtatgg acccattctg caggcaaac ctaagtccgt gtccgtggac 1140
gtggggaaag atgcctcctt cagctgtgtc tggcgcgga acccacttcc acggataacc 1200
tggaccgca tgggtggctc tcagggtgctg agctccgggc ccacgctgcg gcttccgtcc 1260
gtggcactgg aggatgcggg cgactatgta tgcagggtg agccgaggag aacgggtctg 1320
ggaggcggca aagcgcaggc gaggctgact gtgaacgcac cccctgtagt gacagccctg 1380
caacctgcac cagcctttct gaggggtcct gctcgctcc agtgtgtggt gtttgcctcc 1440
cctgccccag actcgggtgg ttggtcttgg gacgagggt tcttggaggc aggctcactg 1500
ggcaggttcc tagtggaagc cttcccagcc ccggaagtgg aggggggaca gggccctggc 1560
cttatttctg tgctacacat ttccggaacc caggagtccg actttaccac cggttcaac 1620
tgcagtccc gcaaccggct aggagaggga cgagtccaga tccacttggg ccgtagagat 1680
ttgctgccta ctgtccggat tgtggctggt gcagcatctg cagccacctc tctccttatg 1740
gtcatcactg gagtggctct ctgctgctgg cgccatggct ctctctctaa gcaaaagaac 1800
ttggtccgga tcccaggaag cagcgagggt tccagttcac gtggccctga ggaggagaca 1860
ggcagcagtg aggaccgggg tccatttgat cacaccgacc acagtgattt ggttcttgag 1920
gaaaaagagg ctctggagac aaaggatcca accaacggtt actacaaggt tcgaggggtc 1980
agtgtgagcc ttagccttgg ggaagctcct ggaggaggcc tcttcttgcc accgccctct 2040
ccgatcggtc tcccagggac tcctacttac tatgacttca agccacatct ggacttagtc 2100
cctccctgca gactgtacag agcgagggca ggttatctta ccacccccca tccccgtgcc 2160
ttcaccagct acatgaaacc cacatccttt ggacccccag atttgagctc tggaactccc 2220
cccttcccgt atgctacctt gtctccaccc agccaccagc gtctccagac tcatgtgtga 2280
atccatctct ccaagtgaag ggtcttggaa tcttctgttt gccatatagt gtgtgttcca 2340
gatttctggg gagtgcagaac aagttgatga ccaaccctc caaaactgaa cattgaagga 2400
gggaaagatc attacaagca tcaggactgt tgggtgtacac tcagttcagc caaagtggat 2460

tctccaagtg ggagcaatat ggccgctttc ccatgagaaa gacattcaag atggtgacta 2520
aatgactaaa tactttgcag agggacaaag atgggaacta gggatacgga tggaagtagt 2580
agagaagata tatgaccatc tgcataaga ggaaggataa catatgacaa atcaagatga 2640
aagaaataat ccaccccacc cccaccgctt cctggccaat aagtatagcc tacatggctg 2700
ttcattatct gggaacccaa atggccacta tcttgactcc ttccttaaag atacagaaag 2760
aattgaatcc aaggaatggg gtaggggtga aatagaagaa atgaagggga ctcttgggct 2820
aagaatactt atgtttaata ataaaagggg gaggcaaaga tgcaaaaaaa aaaaaa 2876

<210> 2

<211> 2243

<212> DNA

<213> mouse

<400> 2

gagagaattg tgtgcagaga gaggctccag tccagcgtgg tgtgagaggc gtgctatcaa 60
gaaagaagtt ggaggggaac cagtgcacc ctaactctac gagatcttgg ggtacacaca 120
ctcgggatgc tggcctccgc cctcctcggt ttcctttgct gtttcaaagg acatgcaggg 180
tggtcccggg actggatata ggggaattca gccagtggcc agcatgacct ccacattaag 240
cctgtggaat tggaagatga ggcatcgat gagtgccagg cttcgcaagc aggtctccga 300
tcacgaccag cccaactgca cgtgatgggc cccccagaag ctccccaggt actaggcggc 360
ccctctgtgt ctctggttgc tggagttcct ggaaatctga cctgtcggag tcgtggggat 420
tcccgaactg cccctgaact actgtggttc cgagatggga tccggctgga tgcgagcagc 480
ttccaccaga ccacgtgaa ggacaaggcc actggaacag tggaacacac cttattcctg 540
accccttcca gtcatgatga tggcgccacc ttgatctgca gagcgccaag ccaggccctg 600
cccacaggga gggacacagc tgttacactg agccttcagt atcccccaat ggtgactctg 660
tctgctgagc ccagactgt gcaggaggga gagaaggtga ctttcctgtg tcaagccact 720
gcccagcctc ctgtcactgg ctacaggtgg gcgaaggggg gatccccggt gctcggggca 780
cgtgggcca a ggttggagggt cgttcagat gccactttcc tgactgagcc ggtgtcctgc 840

gaggtcagca acgcggtcgg aagcgccaac cgcagcacgg cgctggaagt gttgtatgga 900
ccattctgc aggcaaaacc taagtccgtg tccgtggacg tggggaaaga tgcctccttc 960
agctgtgtct ggcgcgggaa ccacttcca cggataacct ggaccgcat ggggtggctct 1020
caggtgctga gctccgggcc cacgtgcgg cttccgtccg tggcactgga ggatgcgggc 1080
gactatgtat gcagggtga gccgaggaga acgggtctgg gaggcggcaa agcgcaggcg 1140
aggctgactg tgaacgcacc ccctgtagtg acagccctgc aacctgcacc agcctttctg 1200
aggggtcctg ctgcctcca gtgtgtggtg tttgcctccc ctgcccaga ctcggtggtt 1260
tggtcttggg acgagggtt cttggaggca ggctcactgg gcaggttctt agtgaagcc 1320
ttcccagccc cggaagtga ggggggacag ggccctggcc ttatttctgt gctacacatt 1380
tccggaacc aggagtcca ctttaccacc ggcttcaact gcagtgccg caaccggcta 1440
ggagaggac gagtccagat ccacttgggc cgtagagatt tgctgcctac tgtccggatt 1500
gtggctggtg cagcatctgc agccacctt ctccttatgg tcatcactgg agtggctctc 1560
tgctgctggc gccatggctc tctctctaag caaaagaact tggccggat cccaggaagc 1620
agcgagggtt ccagttcacg tggccctgag gaggagacag gcagcagtga ggaccggggt 1680
ccattgtgc acaccgacca cagtgatttg gttcttgagg aaaaagaggc tctggagaca 1740
aaggatccaa ccaacggtta ctacaagggt cgaggggtca gtgtgagcct tagccttggg 1800
gaagctcctg gaggaggcct cttcttgcca ccgccctctc cgatcggctt cccagggact 1860
cctacttact atgacttcaa gccacatcag gacttagtcc ctccctgcag actgtacaga 1920
gcgagggcag gttatcttac cccccccat cccgtgcct tcaccagcta catgaaacc 1980
acatcctttg gacccccaga tttagctct ggaactcccc ccttcccgtg tgctaccttg 2040
tctccacca gccaccagcg tctccagact catgtgtgaa tccatctctc caagtgaagg 2100
gtcttggat cttctgtttg ccatatagtg tgtgtccag atttctgggg agtcagaaca 2160
agttgatgac caaccctcc aaaactgaac attgaaggag ggaaagatca ttacaagcat 2220
caggactgtt ggtgtacact cag 2243

<210> 3

<211> 700

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Met Leu Ala Ser Ala Leu Leu Val Phe Leu Cys Cys Phe Lys Gly His
1 5 10 15

Ala Gly Ser Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp Met Val Val
20 25 30

Leu Leu Gly Glu Glu Ala Arg Leu Pro Cys Ala Leu Gly Ala Tyr Arg
35 40 45

Gly Leu Val Gln Trp Thr Lys Asp Gly Leu Ala Leu Gly Gly Glu Arg
50 55 60

Asp Leu Pro Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn Ser Ala Ser
65 70 75 80

Gly Gln His Asp Leu His Ile Lys Pro Val Glu Leu Glu Asp Glu Ala
85 90 95

Ser Tyr Glu Cys Gln Ala Ser Gln Ala Gly Leu Arg Ser Arg Pro Ala
100 105 110

Gln Leu His Val Met Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val Leu Gly Gly
115 120 125

Pro Ser Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Gly Asn Leu Thr Cys Arg
130 135 140

Ser Arg Gly Asp Ser Arg Pro Ala Pro Glu Leu Leu Trp Phe Arg Asp
145 150 155 160

Gly Ile Arg Leu Asp Ala Ser Ser Phe His Gln Thr Thr Leu Lys Asp
165 170 175

Lys Ala Thr Gly Thr Val Glu Asn Thr Leu Phe Leu Thr Pro Ser Ser
180 185 190

His Asp Asp Gly Ala Thr Leu Ile Cys Arg Ala Arg Ser Gln Ala Leu
195 200 205

Pro Thr Gly Arg Asp Thr Ala Val Thr Leu Ser Leu Gln Tyr Pro Pro
210 215 220

Met Val Thr Leu Ser Ala Glu Pro Gln Thr Val Gln Glu Gly Glu Lys
225 230 235 240

Val Thr Phe Leu Cys Gln Ala Thr Ala Gln Pro Pro Val Thr Gly Tyr
245 250 255

Arg Trp Ala Lys Gly Gly Ser Pro Val Leu Gly Ala Arg Gly Pro Arg
260 265 270

Leu Glu Val Val Ala Asp Ala Thr Phe Leu Thr Glu Pro Val Ser Cys
275 280 285

Glu Val Ser Asn Ala Val Gly Ser Ala Asn Arg Ser Thr Ala Leu Glu

290

295

300

Val Leu Tyr Gly Pro Ile Leu Gln Ala Lys Pro Lys Ser Val Ser Val
305 310 315 320

Asp Val Gly Lys Asp Ala Ser Phe Ser Cys Val Trp Arg Gly Asn Pro
325 330 335

Leu Pro Arg Ile Thr Trp Thr Arg Met Gly Gly Ser Gln Val Leu Ser
340 345 350

Ser Gly Pro Thr Leu Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Glu Asp Ala Gly
355 360 365

Asp Tyr Val Cys Arg Ala Glu Pro Arg Arg Thr Gly Leu Gly Gly Gly
370 375 380

Lys Ala Gln Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Pro Pro Val Val Thr Ala
385 390 395 400

Leu Gln Pro Ala Pro Ala Phe Leu Arg Gly Pro Ala Arg Leu Gln Cys
405 410 415

Val Val Phe Ala Ser Pro Ala Pro Asp Ser Val Val Trp Ser Trp Asp
420 425 430

Glu Gly Phe Leu Glu Ala Gly Ser Leu Gly Arg Phe Leu Val Glu Ala
435 440 445

Phe Pro Ala Pro Glu Val Glu Gly Gly Gln Gly Pro Gly Leu Ile Ser
450 455 460

Val Leu His Ile Ser Gly Thr Gln Glu Ser Asp Phe Thr Thr Gly Phe
465 470 475 480

Asn Cys Ser Ala Arg Asn Arg Leu Gly Glu Gly Arg Val Gln Ile His
485 490 495

Leu Gly Arg Arg Asp Leu Leu Pro Thr Val Arg Ile Val Ala Gly Ala
500 505 510

Ala Ser Ala Ala Thr Ser Leu Leu Met Val Ile Thr Gly Val Val Leu
515 520 525

Cys Cys Trp Arg His Gly Ser Leu Ser Lys Gln Lys Asn Leu Val Arg
530 535 540

Ile Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Ser Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu
545 550 555 560

Thr Gly Ser Ser Glu Asp Arg Gly Pro Ile Val His Thr Asp His Ser
565 570 575

Asp Leu Val Leu Glu Glu Lys Glu Ala Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr
580 585 590

Asn Gly Tyr Tyr Lys Val Arg Gly Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly
595 600 605

Glu Ala Pro Gly Gly Gly Leu Phe Leu Pro Pro Pro Ser Pro Ile Gly
610 615 620

Leu Pro Gly Thr Pro Thr Tyr Tyr Asp Phe Lys Pro His Leu Asp Leu
625 630 635 640

Val Pro Pro Cys Arg Leu Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr
645 650 655

Pro His Pro Arg Ala Phe Thr Ser Tyr Met Lys Pro Thr Ser Phe Gly
660 665 670

Pro Pro Asp Leu Ser Ser Gly Thr Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Thr Leu
675 680 685

Ser Pro Pro Ser His Gln Arg Leu Gln Thr His Val
690 695 700

<210> 4

<211> 650

<212> PRT

<213> mouse

<400> 4

Met Leu Ala Ser Ala Leu Leu Val Phe Leu Cys Cys Phe Lys Gly His
1 5 10 15

Ala Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn Ser Ala Ser Gly Gln
20 25 30

His Asp Leu His Ile Lys Pro Val Glu Leu Glu Asp Glu Ala Ser Tyr
35 40 45

Glu Cys Gln Ala Ser Gln Ala Gly Leu Arg Ser Arg Pro Ala Gln Leu
50 55 60

His Val Met Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val Leu Gly Gly Pro Ser
65 70 75 80

Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Gly Asn Leu Thr Cys Arg Ser Arg
85 90 95

Gly Asp Ser Arg Pro Ala Pro Glu Leu Leu Trp Phe Arg Asp Gly Ile
100 105 110

Arg Leu Asp Ala Ser Ser Phe His Gln Thr Thr Leu Lys Asp Lys Ala
115 120 125

Thr Gly Thr Val Glu Asn Thr Leu Phe Leu Thr Pro Ser Ser His Asp
130 135 140

Asp Gly Ala Thr Leu Ile Cys Arg Ala Arg Ser Gln Ala Leu Pro Thr
145 150 155 160

Gly Arg Asp Thr Ala Val Thr Leu Ser Leu Gln Tyr Pro Pro Met Val
165 170 175

Thr Leu Ser Ala Glu Pro Gln Thr Val Gln Glu Gly Glu Lys Val Thr
180 185 190

Phe Leu Cys Gln Ala Thr Ala Gln Pro Pro Val Thr Gly Tyr Arg Trp
195 200 205

Ala Lys Gly Gly Ser Pro Val Leu Gly Ala Arg Gly Pro Arg Leu Glu
210 215 220

Val Val Ala Asp Ala Thr Phe Leu Thr Glu Pro Val Ser Cys Glu Val
225 230 235 240

Ser Asn Ala Val Gly Ser Ala Asn Arg Ser Thr Ala Leu Glu Val Leu
245 250 255

Tyr Gly Pro Ile Leu Gln Ala Lys Pro Lys Ser Val Ser Val Asp Val
260 265 270

Gly Lys Asp Ala Ser Phe Ser Cys Val Trp Arg Gly Asn Pro Leu Pro
275 280 285

Arg Ile Thr Trp Thr Arg Met Gly Gly Ser Gln Val Leu Ser Ser Gly
290 295 300

Pro Thr Leu Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Glu Asp Ala Gly Asp Tyr
305 310 315 320

Val Cys Arg Ala Glu Pro Arg Arg Thr Gly Leu Gly Gly Gly Lys Ala

325

330

335

Gln Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Pro Pro Val Val Thr Ala Leu Gln
340 345 350

Pro Ala Pro Ala Phe Leu Arg Gly Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val
355 360 365

Phe Ala Ser Pro Ala Pro Asp Ser Val Val Trp Ser Trp Asp Glu Gly
370 375 380

Phe Leu Glu Ala Gly Ser Leu Gly Arg Phe Leu Val Glu Ala Phe Pro
385 390 395 400

Ala Pro Glu Val Glu Gly Gly Gln Gly Pro Gly Leu Ile Ser Val Leu
405 410 415

His Ile Ser Gly Thr Gln Glu Ser Asp Phe Thr Thr Gly Phe Asn Cys
420 425 430

Ser Ala Arg Asn Arg Leu Gly Glu Gly Arg Val Gln Ile His Leu Gly
435 440 445

Arg Arg Asp Leu Leu Pro Thr Val Arg Ile Val Ala Gly Ala Ala Ser
450 455 460

Ala Ala Thr Ser Leu Leu Met Val Ile Thr Gly Val Val Leu Cys Cys
465 470 475 480

Trp Arg His Gly Ser Leu Ser Lys Gln Lys Asn Leu Val Arg Ile Pro
485 490 495

Gly Ser Ser Glu Gly Ser Ser Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu Thr Gly
500 505 510

Ser Ser Glu Asp Arg Gly Pro Ile Val His Thr Asp His Ser Asp Leu
515 520 525

Val Leu Glu Glu Lys Glu Ala Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr Asn Gly
530 535 540

Tyr Tyr Lys Val Arg Gly Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly Glu Ala
545 550 555 560

Pro Gly Gly Gly Leu Phe Leu Pro Pro Pro Ser Pro Ile Gly Leu Pro
565 570 575

Gly Thr Pro Thr Tyr Tyr Asp Phe Lys Pro His Gln Asp Leu Val Pro
580 585 590

Pro Cys Arg Leu Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr Pro His
595 600 605

Pro Arg Ala Phe Thr Ser Tyr Met Lys Pro Thr Ser Phe Gly Pro Pro
610 615 620

Asp Leu Ser Ser Gly Thr Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Thr Leu Ser Pro
625 630 635 640

Pro Ser His Gln Arg Leu Gln Thr His Val

645

650

<210> 5

<211> 2980

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cccagagacc caggccgcgg aactggcagg cgtttcagag cgtcagaggc tgcggatgag 60
cagacttgga ggactccagg ccagagacta ggctgggcga agagtcgagc gtgaaggggg 120
ctccggggcca ggggtgacagg aggcgtgctt gagaggaaga agttgacggg aaggccagtg 180
cgacggcaaa tctcgtgaac cttggggggac gaatgctcag gatgcgggtc cccgccctcc 240
tcgtcctcct cttctgcttc agagggagag caggcccgtc gcccatttc ctgcaacagc 300
cagaggacct ggtggtgctg ctggggggagg aagcccggct gccgtgtgct ctgggcgcct 360
actgggggct agttcagtgg actaagagtg ggctggccct agggggccaa agggacctac 420
cagggtggtc ccggtactgg atatcaggga atgcagccaa tggccagcat gacctccaca 480
ttaggcccgt ggagctagag gatgaagcat catatgaatg tcaggctaca caagcaggcc 540
tccgtccag accagcccaa ctgcacgtgc tgggtccccc agaagcccc caggtgctgg 600
gcggccccctc tgtgtctctg gttgctggag ttcctgcgaa cctgacatgt cggagccgtg 660
gggatgcccg ccctaccct gaattgctgt ggttccgaga tggggtcctg ttgatggag 720
ccaccttcca tcagaccctg ctgaaggaag ggaccctgg gtcagtggag agcaccttaa 780
ccctgacccc tticagccat gatgatggag ccacctttgt ctgccgggcc cggagccagg 840
ccctgcccac aggaagagac acagctatca cactgagcct gcagtacccc ccagaggtga 900
ctctgtctgc ttcgccacac actgtgcagg agggagagaa ggtcattttc ctgtgccagg 960
ccacagccca gcctcctgtc acaggctaca ggtgggcaaa agggggctct cgggtgctcg 1020
gggcccgcgg gccaaaggta gaggtcgtgg cagacgcctc gttcctgact gagcccgtgt 1080

cctgcgaggt cagcaacgcc gtgggtagcg ccaaccgcag tactgcgctg gatgtgctgt 1140
ttgggccgat tctgcaggca aagccggagc cctgttccgt ggacgtgggg gaagacgctt 1200
ccttcagctg cgcctggcgc gggaacccgc ttccacgggt aacctggacc cgccgcggtg 1260
gcgcgcaggt gctgggctct ggagccacac tgcgtcttcc gtcggtgggg cccgaggacg 1320
caggcgacta tgtgtgcaga gctgaggctg ggctatcggg cctgcggggc ggcgccgcgg 1380
aggctcggct gactgtgaac gtcccccag tagtgaccgc cctgcactct gcgcctgcct 1440
tcctgagggg ccctgctcgc ctccagtgtc tggttttcgc ctctcccgcc ccagatgccg 1500
tggtctggtc ttgggatgag ggcttcctgg aggcggggtc gcagggccgg ttcctggtgg 1560
agacattccc tgccccagag agccgcgggg gactgggtcc gggcctgac tctgtgctac 1620
acatttcggg gacccaggag tctgacttta gcaggagctt taactgcagt gcccgaacc 1680
ggctgggcga gggaggtgcc caggccagcc tgggccgtag agacttgctg cccactgtgc 1740
ggatagtggc cggagtggcc gctgccacca caactctcct tatggtcac actggggtgg 1800
ccctctgctg ctggcgccac agcaaggcct cagcctcttt ctccgagcaa aagaacctga 1860
tgcaatccc tggcagcagc gacggctcca gttcacgagg tcctgaagaa gaggagacag 1920
gcagccgcga ggaccggggc cccattgtgc aactgacca cagtgatctg gttctggagg 1980
agaaaggac tctggagacc aaggaccaa ccaacggta ctacaaggtc cgaggagtca 2040
gtgtgagcct gagccttggc gaagcccctg gaggaggtct ctctctgcca ccacctccc 2100
cccttgggc cccagggacc cctaccttct atgacttcaa cccacacctg ggcatggctc 2160
ccccctgcag actttacaga gccagggcag gctatctcac cacacccac cctcgagctt 2220
tcaccagcta catcaaacc acatcctttg ggccccaga tctggcccc gggactcccc 2280
ccttccata tgctgccttc cccacaccta gccaccgcg tctccagact cacgtgtgac 2340
atctttcaa tggaagagtc ctgggatctc caacttgcca taatggattg ttctgatttc 2400
tgaggcgcca ggacaagttg ggcaccttac tcctcaaaa ctgaacaaa ggggagggaa 2460
agatcattac attgtcagg agcatttgta tacagtcagc tcagccaaag gagatgcccc 2520
aagtgggagc aacatggcca ccaatatgc ccacctatt cccggtgtaa aagagattca 2580
agatggcagg taggcccttt gaggagagat ggggacaggg cagtgggtgt tgggagtttg 2640
gggccgggat ggaagttgtt tctagccact gaaagaagat attcaagat gaccatctgc 2700
attgagagga aaggtagcat aggatagatg aagatgaaga gcataccagg cccaccctg 2760
gctctccctg aggggaactt tgctcgcca atggaaatgc agccaagatg gccatatact 2820

ccctaggaac ccaagatggc caccatcttg attttacttt ccttaaagac tcagaaagac 2880
ttggacccaa ggagtgggga tacagtgaga attaccactg ttggggcaaa atattgggat 2940
aaaaatatat atgtttaata ataaaaaaaa gtcaaagagg 2980

<210> 6

<211> 708

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Leu Arg Met Arg Val Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Phe Cys Phe
1 5 10 15

Arg Gly Arg Ala Gly Pro Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp
20 25 30

Leu Val Val Leu Leu Gly Glu Glu Ala Arg Leu Pro Cys Ala Leu Gly
35 40 45

Ala Tyr Trp Gly Leu Val Gln Trp Thr Lys Ser Gly Leu Ala Leu Gly
50 55 60

Gly Gln Arg Asp Leu Pro Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn
65 70 75 80

Ala Ala Asn Gly Gln His Asp Leu His Ile Arg Pro Val Glu Leu Glu
85 90 95

Asp Glu Ala Ser Tyr Glu Cys Gln Ala Thr Gln Ala Gly Leu Arg Ser
100 105 110

Arg Pro Ala Gln Leu His Val Leu Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val
115 120 125

Leu Gly Gly Pro Ser Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Ala Asn Leu
130 135 140

Thr Cys Arg Ser Arg Gly Asp Ala Arg Pro Thr Pro Glu Leu Leu Trp
145 150 155 160

Phe Arg Asp Gly Val Leu Leu Asp Gly Ala Thr Phe His Gln Thr Leu
165 170 175

Leu Lys Glu Gly Thr Pro Gly Ser Val Glu Ser Thr Leu Thr Leu Thr
180 185 190

Pro Phe Ser His Asp Asp Gly Ala Thr Phe Val Cys Arg Ala Arg Ser
195 200 205

Gln Ala Leu Pro Thr Gly Arg Asp Thr Ala Ile Thr Leu Ser Leu Gln
210 215 220

Tyr Pro Pro Glu Val Thr Leu Ser Ala Ser Pro His Thr Val Gln Glu
225 230 235 240

Gly Glu Lys Val Ile Phe Leu Cys Gln Ala Thr Ala Gln Pro Pro Val
245 250 255

Thr Gly Tyr Arg Trp Ala Lys Gly Gly Ser Pro Val Leu Gly Ala Arg
260 265 270

Gly Pro Arg Leu Glu Val Val Ala Asp Ala Ser Phe Leu Thr Glu Pro
275 280 285

Val Ser Cys Glu Val Ser Asn Ala Val Gly Ser Ala Asn Arg Ser Thr
290 295 300

Ala Leu Asp Val Leu Phe Gly Pro Ile Leu Gln Ala Lys Pro Glu Pro
305 310 315 320

Val Ser Val Asp Val Gly Glu Asp Ala Ser Phe Ser Cys Ala Trp Arg
325 330 335

Gly Asn Pro Leu Pro Arg Val Thr Trp Thr Arg Arg Gly Gly Ala Gln
340 345 350

Val Leu Gly Ser Gly Ala Thr Leu Arg Leu Pro Ser Val Gly Pro Glu
355 360 365

Asp Ala Gly Asp Tyr Val Cys Arg Ala Glu Ala Gly Leu Ser Gly Leu
370 375 380

Arg Gly Gly Ala Ala Glu Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Pro Pro Val
385 390 395 400

Val Thr Ala Leu His Ser Ala Pro Ala Phe Leu Arg Gly Pro Ala Arg

405

410

415

Leu Gln Cys Leu Val Phe Ala Ser Pro Ala Pro Asp Ala Val Val Trp

420

425

430

Ser Trp Asp Glu Gly Phe Leu Glu Ala Gly Ser Gln Gly Arg Phe Leu

435

440

445

Val Glu Thr Phe Pro Ala Pro Glu Ser Arg Gly Gly Leu Gly Pro Gly

450

455

460

Leu Ile Ser Val Leu His Ile Ser Gly Thr Gln Glu Ser Asp Phe Ser

465

470

475

480

Arg Ser Phe Asn Cys Ser Ala Arg Asn Arg Leu Gly Glu Gly Gly Ala

485

490

495

Gln Ala Ser Leu Gly Arg Arg Asp Leu Leu Pro Thr Val Arg Ile Val

500

505

510

Ala Gly Val Ala Ala Ala Thr Thr Thr Leu Leu Met Val Ile Thr Gly

515

520

525

Val Ala Leu Cys Cys Trp Arg His Ser Lys Ala Ser Ala Ser Phe Ser

530

535

540

Glu Gln Lys Asn Leu Met Arg Ile Pro Gly Ser Ser Asp Gly Ser Ser

545

550

555

560

Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu Glu Thr Gly Ser Arg Glu Asp Arg Gly
565 570 575

Pro Ile Val His Thr Asp His Ser Asp Leu Val Leu Glu Glu Lys Gly
580 585 590

Thr Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr Asn Gly Tyr Tyr Lys Val Arg Gly
595 600 605

Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly Glu Ala Pro Gly Gly Gly Leu Phe
610 615 620

Leu Pro Pro Pro Ser Pro Leu Gly Pro Pro Gly Thr Pro Thr Phe Tyr
625 630 635 640

Asp Phe Asn Pro His Leu Gly Met Val Pro Pro Cys Arg Leu Tyr Arg
645 650 655

Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr Pro His Pro Arg Ala Phe Thr Ser
660 665 670

Tyr Ile Lys Pro Thr Ser Phe Gly Pro Pro Asp Leu Ala Pro Gly Thr
675 680 685

Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Ala Phe Pro Thr Pro Ser His Pro Arg Leu
690 695 700

Gln Thr His Val
705

<210> 7

<211> 2976

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gggaactggc aggcgtttca gagcgtcaga ggctgcggat gagcagactt ggaggactcc 60
aggccagaga ctaggctggg cgaagagtcg agcgtgaagg gggctccggg ccagggtgac 120
aggaggcgtg cttgagagga agaagttgac gggaaggcca gtgcgacggc aaatctcgtg 180
aaccttgggg gacgaatgct caggatgcgg gtccccgcc tcctcgtcct cctctttctg 240
ttcagaggga gagcaggccc gtcgccccat ttcttgaac agccagagga cctggtggtg 300
ctgctggggg aggaagcccg gctgccgtgt gctctgggcg cctactgggg gctagttcag 360
tggactaaga gtgggctggc cctagggggc caaagggacc taccagggtg gtcccggtac 420
tggatatcag ggaatgcagc caatggccag catgacctcc acattaggcc cgtggagcta 480
gaggatgaag catcatatga atgtcaggct acacaagcag gcctccgctc cagaccagcc 540
caactgcacg tgctggtccc ccagaagcc cccaggtgc tgggcggccc ctctgtgtct 600
ctggttgctg gatttctgc gaacctgaca tgctggagcc gtggggatgc ccgccctgcc 660
cctgaattgc tgtggttccg agatggggtc ctgttgatg gagccacctt ccatcagacc 720
ctgctgaagg aagggacccc tgggtcagtg gagagcacct taaccctgac cccctttcag 780
ccatgatgat ggagccacct ttgtctgccg ggcccggagc caggccctgc ccacaggaag 840
agacacagct atcacactga gcctgcagta cccccagag gtgactctgt ctgcttcgcc 900
acacactgtg caggagggag agaaggtcat tttctgtgc caggccacag cccagcctcc 960
tgtcacaggc tacagggtgg caaaagggg ctctccggtg ctcggggccc gcgggccaag 1020
gttagaggtc gtggcagacg cctcgttcct gactgagccc gtgtcctgcg aggtcagcaa 1080
cgccgtgggt agcgccaacc gcagtactgc gctggatgtg ctgtttgggc cgattctgca 1140
ggcaaagccg gagcccgtgt ccgtggacgt gggggaagac gcttccttca gctgcgcctg 1200
gcgcgggaac ccgcttcac gggtaacctg gaccgcgcg ggtggcgcgc aggtgctggg 1260

ctctggagcc acactgcgtc ttccgtcggg ggggcccag gacgcaggcg actatgtgtg 1320
cagagctgag gctgggctat cgggcctgcg gggcgggcgcc gcggaggctc ggctgactgt 1380
gaacgctccc ccagtagtga ccgccctgca ctctgcgcct gccttcctga ggggccctgc 1440
tcgcctccag tgtctggttt tcgcctctcc cgccccagat gccgtgggtct ggtcttgga 1500
tgagggcttc ctggaggcgg ggtcgcaggg ccggttcctg gtggagacat tccctgcccc 1560
agagagccgc gggggactgg gtccgggcct gatctctgtg ctacacattt cggggaccca 1620
ggagtctgac tttagcagga gctttaactg cagtgcccg aaccggctgg gcgaggagg 1680
tgcccaggcc agcctgggcc gtagagactt gctgcccact gtgcggatag tggccggagt 1740
ggccgctgcc accacaactc tccttatggt catcactggg gtggccctct gctgctggcg 1800
ccacagcaag gcctcagcct ctttctccga gcaaaagaac ctgatgcga tccctggcag 1860
cagcgacggc tccagttcac gaggtcctga agaagaggag acaggcagcc gcgaggaccg 1920
gggccccatt gtgcacactg accacagtga tctggttctg gaggaggaag ggactctgga 1980
gaccaaggac ccaaccaacg gttactacaa ggtccgagga gtcagtgtga gcctgagcct 2040
tggcgaagcc cctggaggag gtctcttcct gccaccacc tcccccttg gggccccagg 2100
gaccctacc ttctatgact tcaaccaca cctgggcatg gtccccctt gcagacttta 2160
cagagccagg gcaggctatc tcaccacacc ccacctcga gctttcacca gctacatcaa 2220
accacatcc tttgggcccc cagatctggc ccccgaggact ccccccttc catatgctgc 2280
cttccccaca cctagccacc cgcgctcca gactcacgtg tgacatcttt ccaatggaag 2340
agtcctggga tctccaactt gccatcctgg attgttctga tttctgagga gccaggacaa 2400
gttggcgacc ttactcctcc aaaactgaac acaaggggag ggaaagatca ttacatttgt 2460
caggagcatt tgtatacagt cagctcagcc aaaggagatg cccaagtgg gagcaacatg 2520
gccaccaat atgcccacct attccccggt gtaaaagaga ttcaagatgg caggtaggcc 2580
ctttgaggag agatggggac agggcagtgg gtgttgggag tttggggccg ggatggaagt 2640
tgtttctagc cactgaaaga agatatttca agatgaccat ctgcattgag aggaaaggta 2700
gcataggata gatgaagatg aagagcatac caggccccac cctggctctc cctgagggga 2760
actttgctcg gccaatggaa atgcagccaa gatggccata tactccctag gaaccaaga 2820
tggccaccat cttgatatta ctttccttaa agacacagaa agacttgac ccaaggagt 2880
gggatacagt gagaattacc actgttgggg caaaatattg ggataaaaat atttatgttt 2940
aataataaaa aaaagtcaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2976

<210> 8

<211> 196

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Leu Arg Met Arg Val Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Phe Cys Phe
1 5 10 15

Arg Gly Arg Ala Gly Pro Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp
20 25 30

Leu Val Val Leu Leu Gly Glu Glu Ala Arg Leu Pro Cys Ala Leu Gly
35 40 45

Ala Tyr Trp Gly Leu Val Gln Trp Thr Lys Ser Gly Leu Ala Leu Gly
50 55 60

Gly Gln Arg Asp Leu Pro Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn
65 70 75 80

Ala Ala Asn Gly Gln His Asp Leu His Ile Arg Pro Val Glu Leu Glu
85 90 95

Asp Glu Ala Ser Tyr Glu Cys Gln Ala Thr Gln Ala Gly Leu Arg Ser
100 105 110

Arg Pro Ala Gln Leu His Val Leu Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val
115 120 125

Leu Gly Gly Pro Ser Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Ala Asn Leu
130 135 140

Thr Cys Arg Ser Arg Gly Asp Ala Arg Pro Ala Pro Glu Leu Leu Trp
145 150 155 160

Phe Arg Asp Gly Val Leu Leu Asp Gly Ala Thr Phe His Gln Thr Leu
165 170 175

Leu Lys Glu Gly Thr Pro Gly Ser Val Glu Ser Thr Leu Thr Leu Thr
180 185 190

Pro Phe Gln Pro
195

<210> 9

<211> 1532

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

cccagagacc caggccgcgg aactggcagg cgtttcagag cgtcagaggc tgcggatgag 60
cagacttgga ggactccagg ccagagacta ggctgggcga agagtcgagc gtgaaggggg 120
ctccggggcca ggggtgacagg aggcgtgctt gagaggaaga agttgacggg aaggccagtg 180
cgacggcaaa tctcgtgaac cttggggggac gaatgctcag gatgcggggtc cccgccctcc 240

tcgtcctcct ctcttgcttc agaggagag caggcccgtc gccccatttc ctgcaacagc 300
cagaggacct ggtggtgctg ctgggcgagg gaggtgccca ggccagcctg ggccgtagag 360
cctcagcctc tttctccgag caaaagaacc tgatgcgaat ccctggcagc agcgacggct 420
ccagttcacg aggtcctgaa gaagaggaga caggcagccg cgaggaccgg ggccccattg 480
tgcacactga ccacagtgat ctggttctgg aggaggaagg gactctggag accaaggacc 540
caaccaacgg ttactacaag gtccgaggag tcagtgtgag cctgagcctt ggccaagccc 600
ctggaggagg tctcttcctg ccaccaccct ccccccttgg gccccaggg acccctacct 660
tctatgactt caaccacac ctgggcatgg tcccccttg cagactttac agagccaggg 720
caggctctct caccacaccc caccctcgag ctttcaccag ctacatcaaa cccacatcct 780
ttgggcccc agatctggcc cccgggactc cccccctccc atatgtctgc tccccacac 840
ctagccaccc gcgtctccag actcacgtgt gacatctttc caatggaaga gtcctgggat 900
ctccaacttg ccataatgga ttgttctgat ttctgaggag ccaggacaag ttggcgacct 960
tactcctcca aaactgaaca caaggggagg gaaagatcat tacatttgctc aggagcatit 1020
gtatacagtc agctcagcca aaggagatgc cccaagtggg agcaacatgg ccaccaata 1080
tgcccaccta ttccccggtg taaaagagat tcaagatggc aggtaggccc tttgaggaga 1140
gatggggaca gggcagtggg tggtgggagt ttggggcccg gatggaagtt gtttctagcc 1200
actgaaagaa gatatttcaa gatgaccatc tgcattgaga ggaaaggtag cataggatag 1260
atgaagatga agagcatacc aggccccacc ctggctctcc ctgaggggaa ctttgctcgg 1320
ccaatggaaa tgcagccaag atggccatat actccctagg aaccaagat ggccaccatc 1380
ttgattttac tttccttaaa gactcagaaa gacttggacc caaggagtgg ggatacagtg 1440
agaattacca ctgttggggc aaaatattgg gataaaaata tttatgttta ataataaaaa 1500
aaagtcaaag aggcaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1532

<210> 10

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Leu Arg Met Arg Val Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Phe Cys Phe
1 5 10 15

Arg Gly Arg Ala Gly Pro Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp
20 25 30

Leu Val Val Leu Leu Gly Glu Gly Gly Ala Gln Ala Ser Leu Gly Arg
35 40 45

Arg Ala Ser Ala Ser Phe Ser Glu Gln Lys Asn Leu Met Arg Ile Pro
50 55 60

Gly Ser Ser Asp Gly Ser Ser Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu Glu Thr
65 70 75 80

Gly Ser Arg Glu Asp Arg Gly Pro Ile Val His Thr Asp His Ser Asp
85 90 95

Leu Val Leu Glu Glu Glu Gly Thr Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr Asn
100 105 110

Gly Tyr Tyr Lys Val Arg Gly Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly Glu
115 120 125

Ala Pro Gly Gly Gly Leu Phe Leu Pro Pro Pro Ser Pro Leu Gly Pro
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Thr Phe Tyr Asp Phe Asn Pro His Leu Gly Met Val

145

150

155

160

Pro Pro Cys Arg Leu Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr Pro

165

170

175

His Pro Arg Ala Phe Thr Ser Tyr Ile Lys Pro Thr Ser Phe Gly Pro

180

185

190

Pro Asp Leu Ala Pro Gly Thr Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Ala Phe Pro

195

200

205

Thr Pro Ser His Pro Arg Leu Gln Thr His Val

210

215

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 11

cagctccaca acctacatca ttccgt

26

<210> 12

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 12

acggaatgat gt

12

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 13

gtccatcttc tctctgagac tctggt

26

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 14

accagagtct ca

12

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 15

ctgatgggtg tcttctgtga gtgtgt

26

<210> 16

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for

cDNA amplification

<400> 16

acacactcac ag

12

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 17

ccagcatcga gaatcagtgt gacagt

26

<210> 18

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 18

actgtcacac tg

12

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 19

gtcgatgaac ttcgactgtc gatcgt

26

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 20

acgatcgaca gt

12

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 21

ggctttacac tttatgcttc cggctc

26

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 22

cagctatgac catgattacg ccaagc

26

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 23

aggcgattaa gttgggtaac gccagg

26

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 24

ccagtcacga cgttgtaaaa cgacgg

26

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 25

cttcccgtat gctaccttgt ctccac

26

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 26

tccatctctc caagtgaagg gtcttg

26

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 27

ccaacagtcc tgcatgcttg taatga

26

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 28

tccttcaatg ttcagttttg gagggg

26

【図面の簡単な説明】

【図 1】 65B13-aのcDNA配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列及び膜貫通領域が下線で示される。

【図 2】 65B13-aのcDNA配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列及び膜貫通領域が下線で示される。図 1 の続きを示している。

【図 3】 65B13-bのcDNA配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列及び膜貫通領域が下線で示される。

【図 4】 65B13-bのcDNA配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列及び膜貫通領域が下線で示される。図 3 の続きを示している。

【図 5】 65B13-a及び65B13-bのアミノ酸配列の比較した図である。

【図 6】 65B13の構造の模式図である。黒く塗りつぶされた部分は膜貫通領域を、またIgは、Igドメインを示す。

【図 7】 E12.5マウス脳における65B13mRNAの発現をin situハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す写真である。A:矢状断面、B:傍矢状断面。HB:後脳、MB:中脳、SC:脊髄、CB:小脳原基。

【図 8】 E12.5マウス脊髄における65B13mRNAの発現をin situハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す写真である。A:65B13、B:NCAM、C:65B13、Ki67、及びNCAMの発現領域の比較(各々、A及びBの枠内部分を拡大して示す)。

【図 9】 E12.5マウス中脳腹側における65B13mRNA、及びチロシンヒドロキシラーゼ(TH)mRNAの発現をin situハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す写真である。A:65B13、B:TH。

【図 10】 65B13の中脳における発現パターンを示す模式図である。

【図 11】 65B13の発現時期を示す模式図である。

【図 12】 抗65B13抗体を用いたドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離及び活用法を示す模式図である。

【書類名】

図面

【図 1】

GAT	GAG	CCA	GAT	TTC	GGG	GAC	TCT	GGG	CCA	GAC	ATA	AAA	TCT	TCC	AGC	CCG	GAG	54
AGA	ATT	GTG	TGC	AGA	GAG	GGG	CTC	CAG	TCC	AGC	GTG	GTG	TGA	GAG	GCG	TGC	TAT	108
CAA	GAA	AGA	AGT	TGG	AGG	GGA	ACC	AGT	GCA	ACC	CTA	ACT	CTA	CGA	GAT	CTT	GGG	162
GTA	CAC	ACA	CTC	GGG	ATG	CTG	GCC	TCC	GCC	CTC	CTC	GTT	TTC	CTT	TGC	TGT	TTC	216
M L A S A L L V F L C C F																		
AAA	GGA	CAT	GCA	GGC	TCA	TCG	CCC	CAT	TTC	CTA	CAA	CAG	CCA	GAG	GAC	ATG	GTG	270
K	G	H	A	G	S	S	P	H	F	L	Q	Q	P	E	D	M	V	
GTG	CTG	TTG	GGG	GAG	GAA	GCC	CGG	CTG	CCC	TGC	GCT	CTG	GGC	GCG	TAC	AGG	GGG	324
V	L	L	G	E	E	A	R	L	P	C	A	L	G	A	Y	R	G	
CTC	GTG	CAG	TGG	ACT	AAG	GAT	GGG	CTG	GCT	CTA	GGG	GGC	GAA	AGA	GAC	CTT	CCA	378
L	V	Q	W	T	K	D	G	L	A	L	G	G	E	R	D	L	P	
GGG	TGG	TCC	CGG	TAC	TGG	ATA	TCG	GGG	AAT	TCA	GCC	AGT	GGC	CAG	CAT	GAC	CTC	432
G	W	S	R	Y	W	I	S	G	N	S	A	S	G	Q	H	D	L	
CAC	ATT	AAG	CCT	GTG	GAA	TTG	GAA	GAT	GAG	GCA	TCG	TAT	GAG	TGC	CAG	GCT	TCG	486
H	I	K	P	V	E	L	E	D	E	A	S	Y	E	C	Q	A	S	
CAA	GCA	GGT	CTC	CGA	TCA	CGA	CCA	GCC	CAA	CTG	CAC	GTG	ATG	GTC	CCC	CCA	GAA	540
Q	A	G	L	R	S	R	P	A	Q	L	H	V	M	V	P	P	E	
GCT	CCC	CAG	GTA	CTA	GGC	GGC	CCC	TCT	GTG	TCT	CTG	GTT	GCT	GGA	GTT	CCT	GGA	594
A	P	Q	V	L	G	G	P	S	V	S	L	V	A	G	V	P	G	
AAT	CTG	ACC	TGT	CGG	AGT	CGT	GGG	GAT	TCC	CGA	CCT	GCC	CCT	GAA	CTA	CTG	TGG	648
N	L	T	C	R	S	R	G	D	S	R	P	A	P	E	L	L	W	
TTC	CGA	GAT	GGG	ATC	CGG	CTG	GAT	GCG	AGC	AGC	TTC	CAC	CAG	ACC	ACG	CTG	AAG	702
F	R	D	G	I	R	L	D	A	S	S	F	H	Q	T	T	L	K	
GAC	AAG	GCC	ACT	GGA	ACA	GTG	GAA	AAC	ACC	TTA	TTC	CTG	ACC	CCT	TCC	AGT	CAT	756
D	K	A	T	G	T	V	E	N	T	L	F	L	T	P	S	S	H	
GAT	GAT	GGC	GCC	ACC	TTG	ATC	TGC	AGA	GCG	CGA	AGC	CAG	GCC	CTG	CCC	ACA	GGG	810
D	D	G	A	T	L	I	C	R	A	R	S	Q	A	L	P	T	G	
AGG	GAC	ACA	GCT	GTT	ACA	CTG	AGC	CTT	CAG	TAT	CCC	CCA	ATG	GTG	ACT	CTG	TCT	864
R	D	T	A	V	T	L	S	L	Q	Y	P	P	M	V	T	L	S	
GCT	GAG	CCC	CAG	ACT	GTG	CAG	GAG	GGA	GAG	AAG	GTG	ACT	TTC	CTG	TGT	CAA	GCC	918
A	E	P	Q	T	V	Q	E	G	E	K	V	T	F	L	C	Q	A	
ACT	GCC	CAG	CCT	CCT	GTC	ACT	GGC	TAC	AGG	TGG	GCG	AAG	GGG	GGA	TCC	CCG	GTG	972
T	A	Q	P	P	V	T	G	Y	R	W	A	K	G	G	S	P	V	
CTC	GGG	GCA	CGT	GGG	CCA	AGG	TTG	GAG	GTC	GTT	GCA	GAT	GCC	ACT	TTC	CTG	ACT	1026
L	G	A	R	G	P	R	L	E	V	V	A	D	A	T	F	L	T	
GAG	CCG	GTG	TCC	TGC	GAG	GTC	AGC	AAC	GCG	GTC	GGA	AGC	GCC	AAC	CGC	AGC	ACG	1080
E	P	V	S	C	E	V	S	N	A	V	G	S	A	N	R	S	T	
GCG	CTG	GAA	GTG	TTG	TAT	GGA	CCC	ATT	CTG	CAG	GCA	AAA	CCT	AAG	TCC	GTG	TCC	1134
A	L	E	V	L	Y	G	P	I	L	Q	A	K	P	K	S	V	S	
GTG	GAC	GTG	GGG	AAA	GAT	GCC	TCC	TTC	AGC	TGT	GTC	TGG	CGC	GGG	AAC	CCA	CTT	1188
V	D	V	G	K	D	A	S	F	S	C	V	W	R	G	N	P	L	
CCA	CGG	ATA	ACC	TGG	ACC	CGC	ATG	GGT	GGC	TCT	CAG	GTG	CTG	AGC	TCC	GGG	CCC	1242
P	R	I	T	W	T	R	M	G	G	S	Q	V	L	S	S	G	P	
ACG	CTG	CGG	CTT	CCG	TCC	GTG	GCA	CTG	GAG	GAT	GCG	GAC	TAT	GTA	TGC	AGG		1296
T	L	R	L	P	S	V	A	L	E	D	A	G	D	Y	V	C	R	
GCT	GAG	CCG	AGG	AGA	ACG	GGT	CTG	GGA	GGC	GGC	AAA	GCG	CAG	GCG	AGG	CTG	ACT	1350
A	E	P	R	R	T	G	L	G	G	G	K	A	Q	A	R	L	T	
GTG	AAC	GCA	CCC	CCT	GTA	GTG	ACA	GCC	CTG	CAA	CCT	GCA	CCA	GCC	TTT	CTG	AGG	1404
V	N	A	P	P	V	V	T	A	L	Q	P	A	P	A	F	L	R	

【図 2】

GGT	CCT	GCT	CGC	CTC	CAG	TGT	GTG	GTG	TTT	GCC	TCC	CCT	GCC	CCA	GAC	TCG	GTG	1458
G	P	A	R	L	Q	C	V	V	F	A	S	P	A	P	D	S	V	
GTT	TGG	TCT	TGG	GAC	GAG	GGC	TTC	TTG	GAG	GCA	GGC	TCA	CTG	GGC	AGG	TTC	CTA	1512
V	W	S	W	D	E	G	F	L	E	A	G	S	L	G	R	F	L	
GTG	GAA	GCC	TTC	CCA	GCC	CCG	GAA	GTG	GAG	GGG	GGA	CAG	GGC	CCT	GGC	CTT	ATT	1566
V	E	A	F	P	A	P	E	V	E	G	G	Q	G	P	G	L	I	
TCT	GTG	CTA	CAC	ATT	TCC	GGA	ACC	CAG	GAG	TCC	GAC	TTT	ACC	ACC	GGC	TTC	AAC	1620
S	V	L	H	I	S	G	T	Q	E	S	D	F	T	T	G	F	N	
TGC	AGT	GCC	CGC	AAC	CGG	CTA	GGA	GAG	GGA	CGA	GTC	CAG	ATC	CAC	TTG	GGC	CGT	1674
C	S	A	R	N	R	L	G	E	G	R	V	Q	I	H	L	G	R	
AGA	GAT	TTG	CTG	CCT	ACT	GTC	CGG	ATT	GTG	GCT	GGT	GCA	GCA	TCT	GCA	GCC	ACC	1728
R	D	L	L	P	T	V	R	I	V	A	G	A	A	S	A	A	T	
TCT	CTC	CTT	ATG	GTC	ATC	ACT	GGA	GTG	GTC	CTC	TGC	TGC	TGG	CGC	CAT	GGC	TCT	1782
S	L	L	M	V	I	T	G	V	V	L	C	C	W	R	H	G	S	
CTC	TCT	AAG	CAA	AAG	AAC	TTG	GTC	CGG	ATC	CCA	GGA	AGC	AGC	GAG	GGT	TCC	AGT	1836
L	S	K	Q	K	N	L	V	R	I	P	G	S	S	E	G	S	S	
TCA	CGT	GGC	CCT	GAG	GAG	GAG	ACA	GAG	AGC	AGT	GAG	GAC	CGG	GGT	CCC	ATT	GTG	1890
S	R	G	P	E	E	E	T	G	S	S	E	D	R	G	P	I	V	
CAC	ACC	GAC	CAC	AGT	GAT	TTG	GTT	CTT	GAG	GAA	AAA	GAG	GCT	CTG	GAG	ACA	AAG	1944
H	T	D	H	S	D	L	V	L	E	E	K	E	A	L	E	T	K	
GAT	CCA	ACC	AAC	GGT	TAC	TAC	AAG	GTT	CGA	GGG	GTC	AGT	GTG	AGC	CTT	AGC	CTT	1998
D	P	T	N	G	Y	Y	K	V	R	G	V	S	V	S	L	S	L	
GGG	GAA	GCT	CCT	GGA	GGA	GGC	CTC	TTC	TTG	CCA	CCG	CCC	TCT	CCG	ATC	GGT	CTC	2052
G	E	A	P	G	G	G	L	F	L	P	P	P	S	P	I	G	L	
CCA	GGG	ACT	CCT	ACT	TAC	TAT	GAC	TTC	AAG	CCA	CAT	CTG	GAC	TTA	GTC	CCT	CCC	2106
P	G	T	P	T	Y	Y	D	F	K	P	H	L	D	L	V	P	P	
TGC	AGA	CTG	TAC	AGA	GCG	AGG	GCA	GGT	TAT	CTT	ACC	ACC	CCC	CAT	CCC	CGT	GCC	2160
C	R	L	Y	R	A	R	A	G	Y	L	T	T	P	H	P	R	A	
TTC	ACC	AGC	TAC	ATG	AAA	CCC	ACA	TCC	TTT	GGA	CCC	CCA	GAT	TTG	AGC	TCT	GGA	2214
F	T	S	Y	M	K	P	T	S	F	G	P	P	D	L	S	S	G	
ACT	CCC	CCC	TTC	CCG	TAT	GCT	ACC	TTG	TCT	CCA	CCC	AGC	CAC	CAG	CGT	CTC	CAG	2268
T	P	P	F	P	Y	A	T	L	S	P	P	S	H	Q	R	L	Q	
ACT	CAT	GTG	TGA	ATC	CAT	CTC	TCC	AAG	TGA	AGG	GTC	TTG	GAA	TCT	TCT	GTT	TGC	2322
T	H	V	*															
CAT	ATA	GTG	TGT	TGT	CCA	GAT	TTC	TGG	GGA	GTC	AGA	ACA	AGT	TGA	TGA	CCA	ACC	2376
CCT	CCA	AAA	CTG	AAC	ATT	GAA	GGA	GGG	AAA	GAT	CAT	TAC	AAG	CAT	CAG	GAC	TGT	2430
TGG	TGT	ACA	CTC	AGT	TCA	GCC	AAA	GTG	GAT	TCT	CCA	AGT	GGG	AGC	AAT	ATG	GCC	2484
GCT	TTC	CCA	TGA	GAA	AGA	CAT	TCA	AGA	TGG	TGA	CTA	AAT	GAC	TAA	ATA	CTT	TGC	2538
AGA	GGG	ACA	AAG	ATG	GGA	ACT	AGG	GAT	ACG	GAT	GGA	AGT	AGT	AGA	GAA	GAT	ATA	2592
TGA	CCA	TCT	GCA	TCA	AGA	GGA	AGG	ATA	ACA	TAT	GAC	AAA	TCA	AGA	TGA	AAG	AAA	2646
TAA	TCC	ACC	CCA	CCC	CCA	CCG	CGT	CCT	GGC	CAA	TAA	GTA	TAG	CCT	ACA	TGG	CTG	2700
TTC	ATT	ATC	TGG	GAA	CCA	AAA	TGG	CCA	CTA	TCT	TGA	CTC	CTT	CCT	TAA	AGA	TAC	2754
AGA	AAG	AAT	TGA	ATC	CAA	GGA	ATG	GGG	TAG	GGT	GGA	AAT	AGA	AGA	AAT	GAA	GGG	2808
GAC	TCT	TGG	GCT	AAG	AAT	ACT	TAT	GTT	TAA	TAA	TAA	AAG	GGG	GAG	GCA	AAG	ATG	2862
CAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AA													2876

【図 3】

GAG	AGA	ATT	GTG	TGC	AGA	GAG	AGG	CTC	CAG	TCC	AGC	GTG	GTG	TGA	GAG	GCG	TGC	54
TAT	CAA	GAA	AGA	AGT	TGG	AGG	GGA	ACC	AGT	GCA	ACC	CTA	ACT	CTA	CGA	GAT	CTT	108
GGG	GTA	CAC	ACA	CTC	GGG	ATG	CTG	GCC	TCC	GCC	CTC	CTC	GTT	TTC	CTT	TGC	TGT	162
						M	L	A	S	A	L	L	V	F	L	C	C	
TTC	AAA	GGA	CAT	GCA	GGG	TGG	TCC	CGG	TAC	TGG	ATA	TCG	GGG	AAT	TCA	GCC	AGT	216
F	K	G	H	A	G	W	S	R	Y	W	I	S	G	N	S	A	S	
GGC	CAG	CAT	GAC	CTC	CAC	ATT	AAG	CCT	GTG	GAA	TTG	GAA	GAT	GAG	GCA	TCG	TAT	270
G	Q	H	D	L	H	I	K	P	V	E	L	E	D	E	A	S	Y	
GAG	TGC	CAG	GCT	TCG	CAA	GCA	GGT	CTC	CGA	TCA	CGA	CCA	GCC	CAA	CTG	CAC	GTG	324
E	C	Q	A	S	Q	A	G	L	R	S	R	P	A	Q	L	H	V	
ATG	GTC	CCC	CCA	GAA	GCT	CCC	CAG	GTA	CTA	GGC	GGC	CCC	TCT	GTG	TCT	CTG	GTT	378
M	V	P	P	E	A	P	Q	V	L	G	G	P	S	V	S	L	V	
GCT	GGA	GTT	CCT	GGA	AAT	CTG	ACC	TGT	CGG	AGT	CGT	GGG	GAT	TCC	CGA	CCT	GCC	432
A	G	V	P	G	N	L	T	C	R	S	R	G	D	S	R	P	A	
CCT	GAA	CTA	CTG	TGG	TTC	CGA	GAT	GGG	ATC	CGG	CTG	GAT	GCG	AGC	AGC	TTC	CAC	486
P	E	L	L	W	F	R	D	G	I	R	L	D	A	S	S	F	H	
CAG	ACC	ACG	CTG	AAG	GAC	AAG	GCC	ACT	GGA	ACA	GTG	GAA	AAC	ACC	TTA	TTC	CTG	540
Q	T	T	L	K	D	K	A	T	G	T	V	E	N	T	L	F	L	
ACC	CCT	TCC	AGT	CAT	GAT	GAT	GGC	GCC	ACC	TTG	ATC	TGC	AGA	GCG	CGA	AGC	CAG	594
T	P	S	S	H	D	D	G	A	T	L	I	C	R	A	R	S	Q	
GCC	CTG	CCC	ACA	GGG	AGG	GAC	ACA	GCT	GTT	ACA	CTG	AGC	CTT	CAG	TAT	CCC	CCA	648
A	L	P	T	G	R	D	T	A	V	T	L	S	L	Q	Y	P	P	
ATG	GTG	ACT	CTG	TCT	GCT	GAG	CCC	CAG	ACT	GTG	CAG	GAG	GGA	GAG	AAG	GTG	ACT	702
M	V	T	L	S	A	E	P	Q	T	V	Q	E	G	E	K	V	T	
TTC	CTG	TGT	CAA	GCC	ACT	GCC	CAG	CCT	CCT	GTC	ACT	GGC	TAC	AGG	TGG	GCG	AAG	756
F	L	C	Q	A	T	A	Q	P	P	V	T	G	Y	R	W	A	K	
GGG	GGA	TCC	CCG	GTG	CTC	GGG	GCA	CGT	GGG	CCA	AGG	TTG	GAG	GTC	GTT	GCA	GAT	810
G	G	S	P	V	L	G	A	R	G	P	R	L	E	V	V	A	D	
GCC	ACT	TTC	CTG	ACT	GAG	CCG	GTG	TCC	TGC	GAG	GTC	AGC	AAC	GCG	GTC	GGA	AGC	864
A	T	F	L	T	E	P	V	S	C	E	V	S	N	A	V	G	S	
GCC	AAC	CGC	AGC	ACG	GCG	CTG	GAA	GTG	TTG	TAT	GGA	CCC	ATT	CTG	CAG	GCA	AAA	918
A	N	R	S	T	A	L	E	V	L	Y	G	P	I	L	Q	A	K	
CCT	AAG	TCC	GTG	TCC	GTG	GAC	GTG	GGG	AAA	GAT	GCC	TCC	TTC	AGC	TGT	GTC	TGG	972
P	K	S	V	S	V	D	V	G	K	D	A	S	F	S	C	V	W	
CGC	GGG	AAC	CCA	CTT	CCA	CGG	ATA	ACC	TGG	ACC	CGC	ATG	GGT	GGC	TCT	CAG	GTG	1026
R	G	N	P	L	P	R	I	T	W	T	R	M	G	G	S	Q	V	
CTG	AGC	TCC	GGG	CCC	ACG	CTG	CGG	CTT	CCG	TCC	GTG	GCA	CTG	GAG	GAT	GCG	GGC	1080
L	S	S	G	P	T	L	R	L	P	S	V	A	L	E	D	A	G	
GAC	TAT	GTA	TGC	AGG	GCT	GAG	CCG	AGG	AGA	ACG	GGT	CTG	GGA	GGC	GGC	AAA	GCG	1134
D	Y	V	C	R	A	E	P	R	R	T	G	L	G	G	G	K	A	
CAG	GCG	AGG	CTG	ACT	GTG	AAC	GCA	CCC	CCT	GTA	GTG	ACA	GCC	CTG	CAA	CCT	GCA	1188
Q	A	R	L	T	V	N	A	P	P	V	V	T	A	L	Q	P	A	

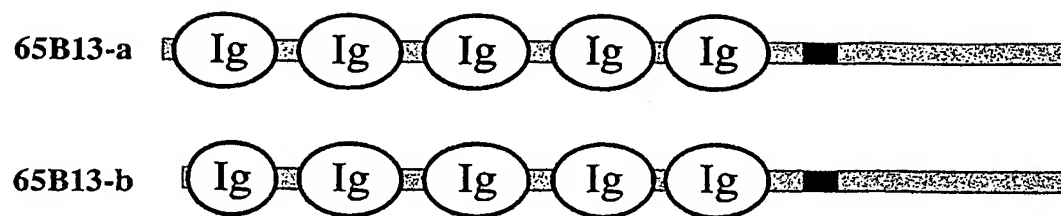
【図 4】

CCA	GCC	TTT	CTG	AGG	GGT	CCT	GCT	CGC	CTC	CAG	TGT	GTG	GTG	TTT	GCC	TCC	CCT	1242
P	A	F	L	R	G	P	A	R	L	Q	C	V	V	F	A	S	P	
GCC	CCA	GAC	TCG	GTG	GTT	TGG	TCT	TGG	GAC	GAG	GGC	TTC	TTG	GAG	GCA	GGC	TCA	1296
A	P	D	S	V	V	W	S	W	D	E	G	F	L	E	A	G	S	
CTG	GGC	AGG	TTC	CTA	GTG	GAA	GCC	TTC	CCA	GCC	CCG	GAA	GTG	GAG	GGG	GGA	CAG	1350
L	G	R	F	L	V	E	A	F	P	A	P	E	V	E	G	G	Q	
GGC	CCT	GGC	CTT	ATT	TCT	GTG	CTA	CAC	ATT	TCC	GGA	ACC	CAG	GAG	TCC	GAC	TTT	1404
G	P	G	L	I	S	V	L	H	I	S	G	T	Q	E	S	D	F	
ACC	ACC	GGC	TTC	AAC	TGC	AGT	GCC	CGC	AAC	CGG	CTA	GGA	GAG	GGA	CGA	GTC	CAG	1458
T	T	G	F	N	C	S	A	R	N	R	L	G	E	G	R	V	Q	
ATC	CAC	TTG	GGC	CGT	AGA	GAT	TTG	CTG	CCT	ACT	GTC	CGG	ATT	GTG	GCT	GGT	GCA	1512
I	H	L	G	R	D	L	L	L	P	T	V	R	I	V	A	G	A	
GCA	TCT	GCA	GCC	ACC	TCT	CTC	CTT	ATG	GTC	ATC	ACT	GGA	GTG	GTC	CTC	TGC	TGC	1566
A	S	A	A	T	S	L	M	V	I	T	G	V	V	L	C	C		
TGG	CGC	CAT	GGC	TCT	CTC	TCT	AAG	CAA	AAG	AAC	TTG	GTC	CGG	ATC	CCA	GGA	AGC	1620
W	R	H	G	S	L	S	K	Q	K	N	L	V	R	I	P	G	S	
AGC	GAG	GGT	TCC	AGT	TCA	CGT	GGC	CCT	GAG	GAG	GAG	ACA	GGC	AGC	AGT	GAG	GAC	1674
S	E	G	S	S	S	R	G	P	E	E	E	T	G	S	S	E	D	
CGG	GGT	CCC	ATT	GTG	CAC	ACC	GAC	CAC	AGT	GAT	TTG	GTT	CTT	GAG	GAA	AAA	GAG	1728
R	G	P	I	V	H	T	D	H	S	D	L	V	L	E	E	K	E	
GCT	CTG	GAG	ACA	AAG	GAT	CCA	ACC	AAC	GGT	TAC	TAC	AAG	GTT	CGA	GGG	GTC	AGT	1782
A	L	E	T	K	D	P	T	N	G	Y	Y	K	V	R	G	V	S	
GTG	AGC	CTT	AGC	CTT	GGG	GAA	GCT	CCT	GGA	GGA	GGC	CTC	TTC	TTG	CCA	CCG	CCC	1836
V	S	L	S	L	G	E	A	P	G	G	G	L	F	L	P	P	P	
TCT	CCG	ATC	GGT	CTC	CCA	GGG	ACT	CCT	ACT	TAC	TAT	GAC	TTC	AAG	CCA	CAT	CAG	1890
S	P	I	G	L	P	G	T	P	T	Y	Y	D	F	K	P	H	Q	
GAC	TTA	GTC	CCT	CCC	TGC	AGA	CTG	TAC	AGA	GCG	AGG	GCA	GGT	TAT	CTT	ACC	ACC	1944
D	L	V	P	P	C	R	L	Y	R	A	R	A	G	Y	L	T	T	
CCC	CAT	CCC	CGT	GCC	TTC	ACC	AGC	TAC	ATG	AAA	CCC	ACA	TCC	TTT	GGA	CCC	CCA	1998
P	H	P	R	A	F	T	S	Y	M	K	P	T	S	F	G	P	P	
GAT	TTG	AGC	TCT	GGA	ACT	CCC	CCC	TTC	CCG	TAT	GCT	ACC	TTG	TCT	CCA	CCC	AGC	2052
D	L	S	S	G	T	P	P	F	P	Y	A	T	L	S	P	P	S	
CAC	CAG	CGT	CTC	CAG	ACT	CAT	GTG	TGA	ATC	CAT	CTC	TCC	AAG	TGA	AGG	GTC	TTG	2106
H	Q	R	L	Q	T	H	V	*										
GAA	TCT	TCT	GTT	TGC	CAT	ATA	GTG	TGT	TGT	CCA	GAT	TTC	TGG	GGA	GTC	AGA	ACA	2160
AGT	TGA	TGA	CCA	ACC	CCT	CCA	AAA	CTG	AAC	ATT	GAA	GGA	GGG	AAA	GAT	CAT	TAC	2214
AAG	CAT	CAG	GAC	TGT	TGG	TGT	ACA	CTC	AG									2241

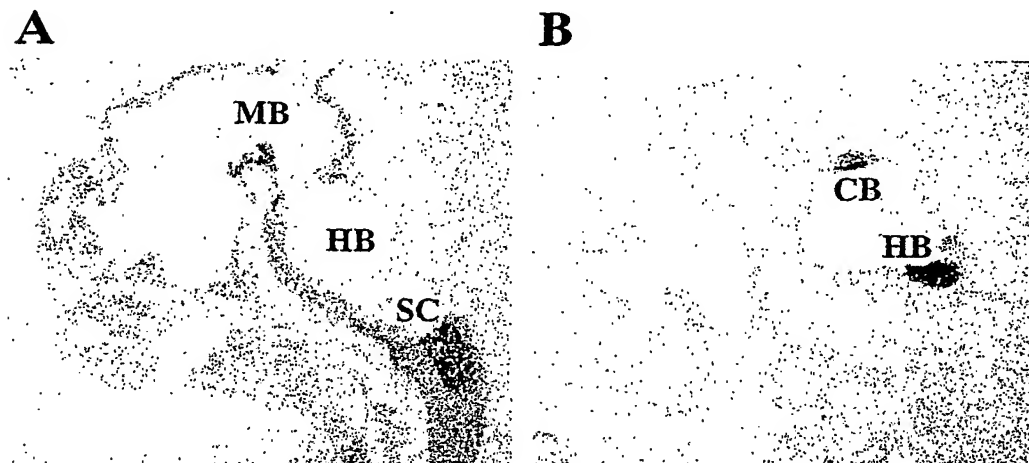
【図 5】

		10	20	30	40	50	
65B13-a	1	MIASALIVF	GGFKGHACSS	PHFLQQPEDM	VVLGGEARL	PCALGAYRGL	50
65B13-b	1	MIASALIVF	GGFKGHAC	-----	-----	-----	50
		60	70	80	90	100	
65B13-a	51	VQWTKDGLAL	GGERDLPCMS	RMILSGNSAS	GOHDLHKKY	REEDFASVTC	100
65B13-b	51	-----	-----	RMILSGNSAS	GOHDLHKKY	REEDFASVTC	100
		110	120	130	140	150	
65B13-a	101	QASQAGLRSP	PAQDHVMVRF	EAPQVTCGEG	VSLVACVPGN	LICRSRGDSR	150
65B13-b	101	QASQAGLRSP	PAQDHVMVRF	EAPVTCGEGS	VSLVACVPGN	LICRSRGDSR	150
		160	170	180	190	200	
65B13-a	151	PAPDLNWRD	GIRLDASSRH	GMFLDKRATC	IVENTILHLP	SSHDEGAMET	200
65B13-b	151	PAPDLNWRD	GIRLDASSRH	GMFLDKRATC	IVENTILHLP	SSHDEGAMET	200
		210	220	230	240	250	
65B13-a	201	GRARSOALEP	GRDIAVTLSE	OYPPVMTLSA	EACIWOEGEK	VITELGOMTAC	250
65B13-b	201	GRARSOALEP	GRDIAVTLSE	OYPPVMTLSA	EACIWOEGEK	VITELGOMTAC	250
		260	270	280	290	300	
65B13-a	251	PPWIGYRWAK	EGSPVFGARG	PRILEVADAT	ELIUFVSCGV	SNVAGSANRS	300
65B13-b	251	PPWIGYRWAK	EGSPVFGARG	PRILEVADAT	ELIUFVSCGV	SNVAGSANRS	300
		310	320	330	340	350	
65B13-a	301	PALEVMYCPH	LOAKPKSVSV	DVCKDASESC	VWRGNPLPRI	ITWRMCGSOV	350
65B13-b	301	PALEVMYCPH	LOAKPKSVSV	DVCKDASESC	VWRGNPLPRI	ITWRMCGSOV	350
		360	370	380	390	400	
65B13-a	351	ESSGPILRLE	SVALLDAGDY	VGRAEPRRTG	ECGGRACARI	ITVNAPEVALE	400
65B13-b	351	ESSGPILRLE	SVALLDAGDY	VGRAEPRRTG	ECGGRACARI	ITVNAPEVALE	400
		410	420	430	440	450	
65B13-a	401	LOPAPATLRG	PARLOCVATE	SPAPDSVWMS	WDEGRELACS	LEREIVAEAP	450
65B13-b	401	LOPAPATLRG	PARLOCVATE	SPAPDSVWMS	WDEGRELACS	LEREIVAEAP	450
		460	470	480	490	500	
65B13-a	451	APPEVEGCGE	GLISVHLHSC	TOESDITMGL	NCSARNRLGE	GRVOITHLGR	500
65B13-b	451	APPEVEGCGE	GLISVHLHSC	TOESDITMGL	NCSARNRLGE	GRVOITHLGR	500
		510	520	530	540	550	
65B13-a	501	DLEEVVRIVA	GAASAATSLH	MVITGVILCC	WRHCSLSKOK	NLVRTPSSSE	550
65B13-b	501	DLEEVVRIVA	GAASAATSLH	MVITGVILCC	WRHCSLSKOK	NLVRTPSSSE	550
		560	570	580	590	600	
65B13-a	551	GSSSRCPREE	TGSSSEDRGP	VHTDHSDEVI	EEKKALHTKI	PINGVAYKRC	600
65B13-b	551	GSSSRCPREE	TGSSSEDRGP	VHTDHSDEVI	EEKKALHTKI	PINGVAYKRC	600
		610	620	630	640	650	
65B13-a	601	VSVSLSLGEA	EGGGEHETPL	SPTEGPELPI	VYDTKPHLDL	VPPCRITRRAR	650
65B13-b	601	VSVSLSLGEA	EGGGEHETPL	SPTEGPELPI	VYDTKPHLDL	VPPCRITRRAR	650
		660	670	680	690	700	
65B13-a	651	AGYETTPHPR	ATSYMKPTIS	EGPPDESSGI	PPEPYATLES	PSHORELOTHV	700
65B13-b	651	AGYETTPHPR	ATSYMKPTIS	EGPPDESSGI	PPEPYATLES	PSHORELOTHV	700

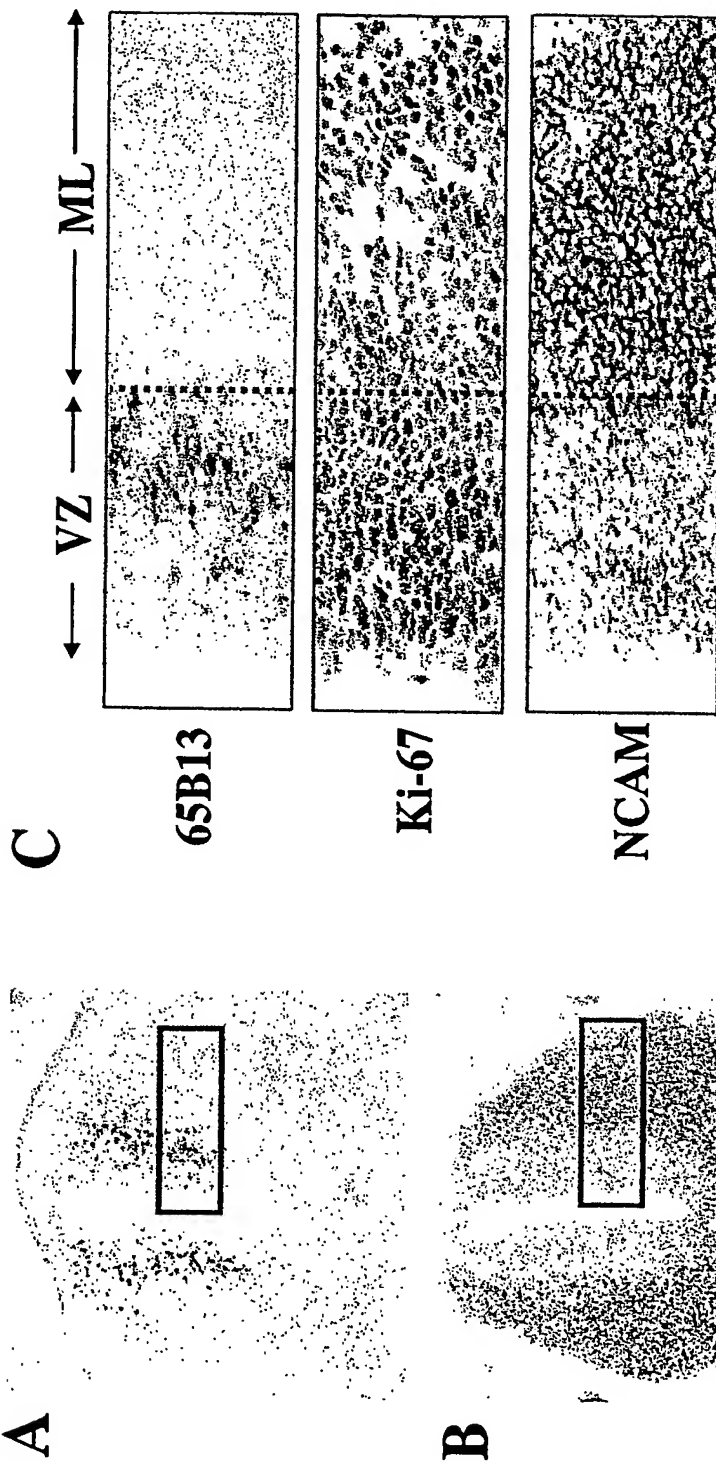
【図 6】



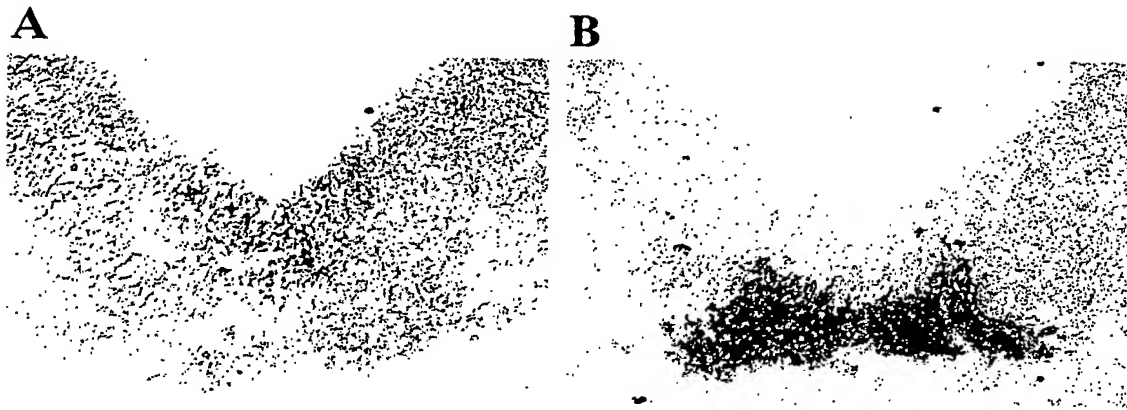
【図 7】



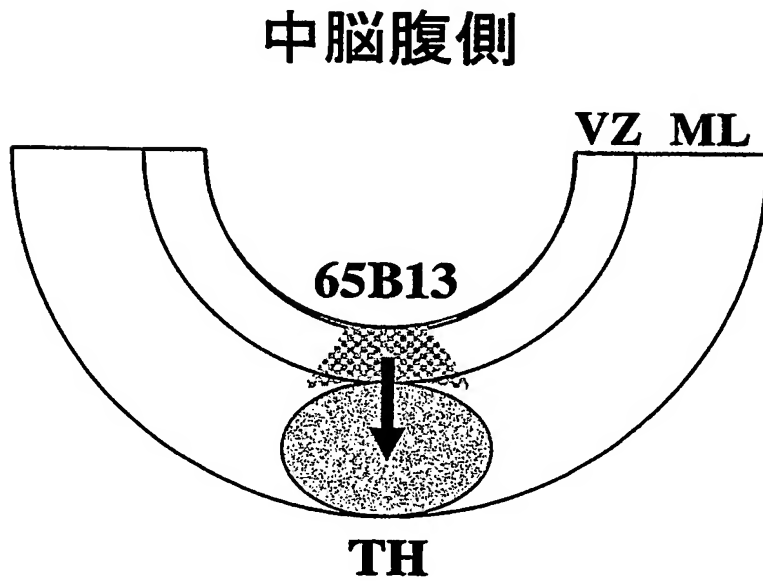
【図 8】



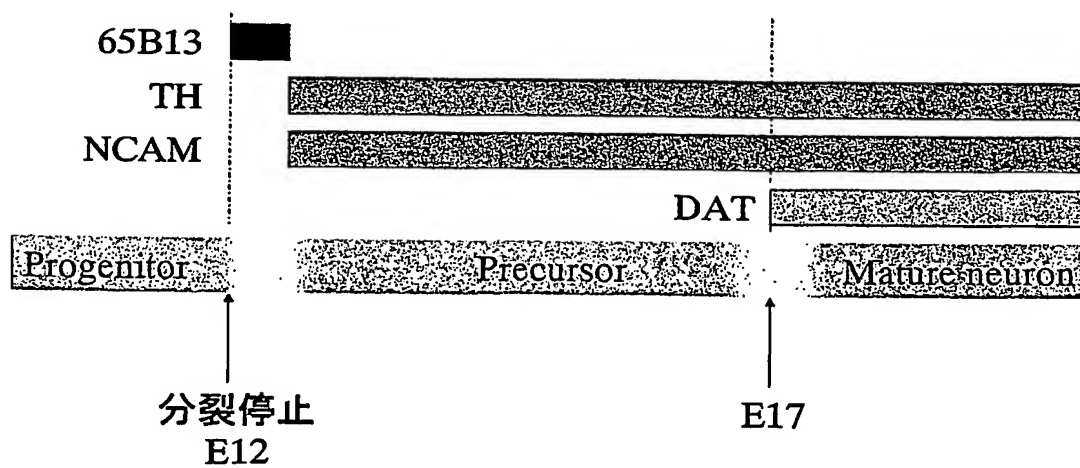
【図 9】



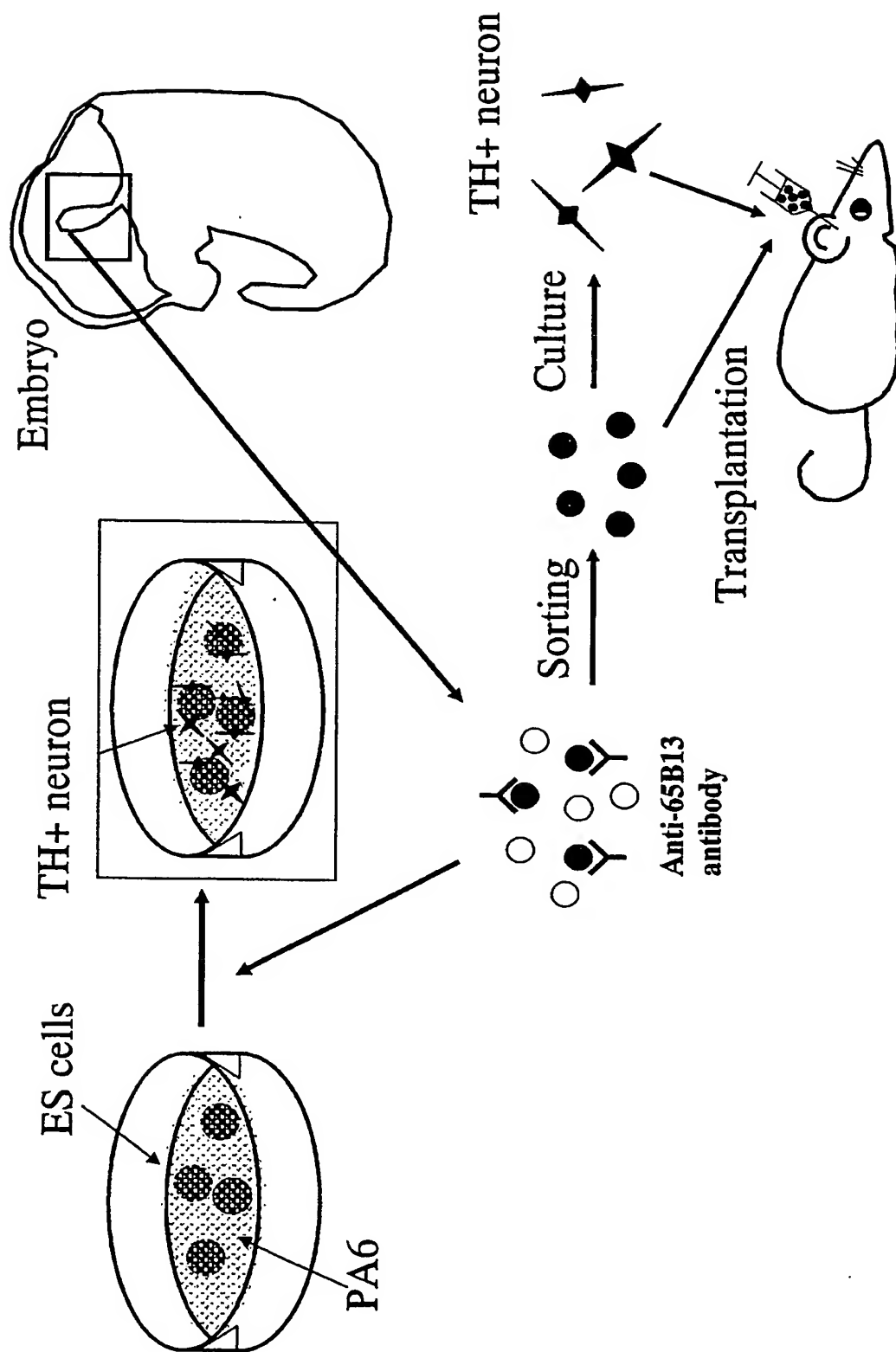
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】神経細胞移植治療においては、安全性の面では目的の細胞種のみからなる細胞群、そして腫瘍形成の危険性を考慮すれば分裂停止後の神経細胞が好ましいと考えられる。さらに、移植先での生存、正しいネットワーク形成能等を考慮するとより早期の前駆細胞により治療効果が増大されると期待される。

【解決手段】本発明により、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する新規遺伝子65B13が得られた。細胞における該65B13の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成面の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となった。

【選択図】 図12

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-307573
受付番号	50201590734
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成 14 年 11 月 15 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000000217
【住所又は居所】	東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 10 号
【氏名又は名称】	エーザイ株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志

【代理人】

【識別番号】	100108774
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	橋本 一憲

次頁無

特願 2002-307573

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名

エーザイ株式会社